INSULINSEKRETION UND REDOXZUSTAND DER PYRIDINNUKLEOTIDE LANGERHANSSCHER INSELN VON FOETALEN, NEUGEBORENEN, ERWACHSENEN UND ALTEN RATTEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Gisela Bumiller
aus Heilbronn

1982

INSULINSEKRETION UND REDOXZUSTAND DER PYRIDINNUKLEOTIDE LANGERHANSSCHER INSELN VON FOETALEN, NEUGEBORENEN, ERWACHSENEN UND ALTEN RATTEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Gisela Bumiller
aus Heilbronn

1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Mai 1982

Dekan: Prof. Dr. E. Reinhard

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.P.T. Ammon

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard

Die vorliegende Arbeit wurde im Mai 1979 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im März 1982 abgeschlossen.

Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung und stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Ferner danke ich allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Ammon für stete Diskussionsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.

Abkürzungen

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ADP	Adenosin-diphosphat
6-AN	6-Aminonicotinsäureamid
ATP	Adenosin-triphosphat
E	Einheiten
ΔE	Extinktionsänderung
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure
G-6-P	Glucose-6-phosphat
G-6-P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
Gl-DH	Glutamat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
IRI	immunoreactives Insulin
KRB-Lösung	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung
LDH	Lactat-Dehydrogenase
µE	Mikroeinheiten
µM	mikromolar
µmol	Mikromol
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat, reduziert
n.s.	nicht signifikant
P	Probability
6-PG-DH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
pM	pikomolar
pmol	Pikomol
PPS	Pentosephosphatshunt
SEM	Standard error of the mean
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung

		Seite
1.1.	Stand der Forschung	1
1.1.1.	Insulinsekretion bei Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten	1
1.1.2.	Bedeutung des Glucosemetabolismus Langerhansscher Inseln für die Insulinsekretion	4
1.1.3.	Pyridinnukleotide und ihre Beziehung zur Insulinsekretion	7
1.1.4.	Vergleich des Glucosemetabolismus Langerhansscher Inseln von Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten	10
1.1.5.	Alter und Insulinsekretion	13
1.1.6.	Leucin, Alter und Insulinsekretion	17
1.2.	Fragestellung	20

2. Material und Methodik

2.1.	Versuchstiere	22
2.2.	Geräte	25
2.3.	Chemikalien und Enzyme	25
2.4.	Nähr- und Reagenzlösungen	27
2.4.1.	Hanks' Lösung	27
2.4.2.	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung	27
2.4.3.	Cycling-Reagenz zur NADPH- und NADP-Bestimmung	29
2.4.4.	Phosphogluconat-Reagenz	29
2.4.5.	Cycling-Reagenz zur NADH- und NAD-Bestimmung	30
2.4.6.	Pyruvat-Reagenz	30

Seite

2.5. Standardlösungen und deren Gehaltsbestimmung 31
2.5.1. NADPH-Standard 31
2.5.2. NADP-Standard 33
2.5.3. NADH-Standard 35
2.5.4. NAD-Standard 37
2.6. Isolierung der Langerhansschen Inseln 39
2.6.1. bei erwachsenen Ratten 39
2.6.2. bei neugeborenen und foetalen Ratten 41
2.7. Vorinkubation 44
2.8. Hauptinkubation 44
2.9. Meßmethoden 46
2.9.1. Bestimmung der Pyridinnukleotide 46
2.9.1.1. NADPH und NADP 47
2.9.1.2. NADH und NAD 50
2.9.2. Insulinbestimmung in Gegenwart von Insulin-Antikörpern 53
2.10. Versuchsauswertung 57
2.11. Darstellung der Ergebnisse 57

3. Versuchsergebnisse

3.1. Einfluß von Glucose auf den Gehalt an NADPH und NADP sowie den NADPH/NADP-Quotienten Langerhansscher Inseln bei Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten 58
3.1.1. Erwachsene Ratten 58
3.1.2. Neugeborene, 5 Tage alte Ratten 59
3.1.3. Foeten 60
3.1.4. Erwachsene, Neugeborene und Foeten 61

Seite

3.2. Einfluß von Glucose auf den Gehalt an NADH und NAD sowie den NADH/NAD-Quotienten Langerhansscher Inseln bei Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten 71
3.2.1. Erwachsene Ratten 72
3.2.2. Neugeborene, 5 Tage alte Ratten 73
3.2.3. Foeten 75
3.2.4. Erwachsene, Neugeborene, Foeten 76
3.3. Einfluß von Glucose auf die Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln bei Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten 86
3.3.1. Erwachsene Ratten 87
3.3.2. Neugeborene, 5 Tage alte Ratten 88
3.3.3. Foeten 89
3.3.4. Erwachsene, Neugeborene, Foeten 90
3.4. Einfluß des Alters von 2 Jahren auf den NADPH- und NADP-Gehalt und den NADPH/NADP-Quotienten isolierter Langerhansscher Inseln der Ratte 97
3.4.1. Versuche mit Glucose 97
3.4.2. Versuche mit Leucin 108

4. Diskussion

4.1. Biosynthese und Sekretion von Insulin bei Neugeborenen und Foeten 116
4.1.1. Biosynthese 116

Seite

4.1.2. Einfluß verschiedener Stimulantien auf die Insulinsekretion bei Neugeborenen und Foeten 117
4.1.2.1. Einfluß von Glucose 117
4.1.2.2. Einfluß von Aminosäuren und Sulfonylharnstoffen 119
4.1.2.3. Das Adenylatcyclasesystem 121
4.2. Bedeutung des Glucosemetabolismus Langerhansscher Inseln für die Insulinsekretion bei Neugeborenen und Foeten 122
4.2.1. Bedeutung des NADH / NAD - Quotienten 123
4.2.2. Bedeutung des NADPH / NADP - Quotienten 124
4.2.3. Bedeutung des GSH / GSSG - Quotienten 126
4.3. Regulation des Redoxzustandes durch Enzyme 128
4.4. Bedeutung des Glucosemetabolismus Langerhansscher Inseln für die Insulinsekretion im Alter 136
4.4.1. Bedeutung der Reduktionsäquivalente 136
4.4.2. Einfluß der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und und der Glutathionreduktase auf den Redoxzustand der Inseln im Alter 138
4.4.3. Einfluß von Leucin auf die Pyridinnukleotide im Alter 140

5. Zusammenfassung

5.1. Fragestellung 142
5.2. Ergebnisse 143
5.3. Schlußfolgerungen 145

6. Literaturverzeichnis

1. Einleitung:

1.1. Stand der Forschung

1.1.1. Insulinsekretion bei Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten

Von verschiedener Seite wurde in vergangener Zeit beschrieben, daß Pankreasinseln von Foeten nicht in der Lage sind, auf einen Glucosereiz mit einer entsprechenden Insulinsekretion zu antworten, wie dies bei Erwachsenen der Fall ist.
Diese Untersuchungen wurden zum einen in vivo beim Menschen (1), aber auch bei Primaten (2) und Schafen(3), zum anderen in vitro beim Menschen (4), ebenso bei Ratten (5) und Kaninchen (6) durchgeführt.
Eine Ausnahme stellen die Foeten von Rindern dar, deren Pankreas durch Glucose zur Insulinsekretion angeregt werden kann (7).
Über das quantitative Ausmaß der Fähigkeit der foetalen Pankreasinseln, Insulin zu sezernieren, findet man unterschiedliche Ergebnisse.
Aufgrund von in vitro Versuchen bei Ratten zeigten Asplund et al. (5), daß im perinatalen Stadium, d.h. bei 22 Tage alten Foeten und bei Neugeborenen, die Insulinsekretion durch Glucose nicht stimulierbar ist.

Erst zwei Tage nach der Geburt war in Anwesenheit von 16,7 mM Glucose ein Anstieg der freigesetzten Insulinmenge festzustellen (8).
Auch Heinze und Steinke (9) bestätigen, daß die Insulinsekretion bei den Ratten erst zwischen dem zweiten und dritten Tag nach der Geburt durch Glucose erhöht werden kann.
Sodoyez-Goffaux et al. (10,11) dagegen stellten bei ihren Messungen an foetalen und neugeborenen Ratten zwei Tage vor und zwei Tage nach der Geburt fest, daß bei 16,7 mM Glucose ein Anstieg der Insulinsekretion zu verzeichnen ist.
Das führt sie zu der Schlußfolgerung, daß während der perinatalen Phase keine wesentlichen Veränderungen bezüglich der Fähigkeit zur Insulinfreisetzung im Pankreas der Ratten ablaufen.
Allerdings ist die durch Glucose induzierbare Insulinsekretion dieser isolierten Langerhansschen Inseln wesentlich geringer, als sie bei Erwachsenen zu finden ist. Bei den foetalen Ratten ab dem 19. Tag p.c. und neugeborenen Ratten bis zum zweiten Tag p.p. steigt sie etwa um das zwei- bis dreifache des Kontrollwertes ohne Glucosestimulation an, während sie bei Erwachsenen bei der entsprechenden Glucosekonzentration mindestens auf das fünf- bis zehnfache des Kontrollwertes ansteigt.
Hellerström, Agren, Andersson (12) setzten bei ihren Versuchen an isolierten Pankreasinseln von

neugeborenen Ratten (1 Tag nach der Geburt) geringere Glucosekonzentrationen ein und stellten bereits bei einer Erhöhung der Glucosemenge von 0 auf 1,4 mM eine vermehrte Insulinsekretion fest, die sich jedoch bei weiterer Steigerung der Glucose nicht mehr weiter anheben ließ.
Allerdings beträgt die maximal sezernierte Insulinmenge bei den Neugeborenen nur etwa ein Fünftel der Höhe, die bei Erwachsenen feststellbar ist.
Demzufolge liegen die Langerhansschen Inseln der neugeborenen Ratten auch hier im Bezug auf die quantitative Insulinausschüttung weit unterhalb den Erwachsenen, und man kann sagen, daß nur eine geringe Ansprechbarkeit auf einen Glucosereiz vorliegt.
Die Ursache für diese offensichtliche Sekretions-insuffizienz in dem Entwicklungsstadium um den Zeitpunkt der Geburt ist noch ungeklärt.

1.1.2. Bedeutung des Glucosemetabolismus Langerhansscher Inseln für die Insulinsekretion

Über den Mechanismus, wie Glucose die Langerhanssche Insel zur Freisetzung von Insulin aus den Granula der ß-Zelle veranlaßt, werden unterschiedliche Theorien diskutiert:

1.) Das Glucosemolekül führt über die Reaktion mit einem hypothetischen Rezeptor an der Membran der ß-Zelle zur Insulinsekretion.

Diese These wird gestützt durch die Tatsache, daß die ß-Zelle auf das Stimulans Glucose mit einer unmittelbaren Sekretion antwortet, die Metaboliten des Glucoseabbaus jedoch erst mit einer zeitlichen Verzögerung entstehen (13). Auch durch Blockade der Glykolyse mit Jodacetat unter Bereitstellung von Energie über Pyruvat wird die Insulinsekretion nicht unterdrückt (14).

Die Stereospezifität der Reaktion, d.h. daß nur das α- Anomer der D-Glucose eine Sekretion bewirkt (15), spricht ebenfalls für eine Reaktion des Glucosemoleküls als Ganzes mit einem Rezeptor.

2.) Durch die Verstoffwechselung des Glucosemoleküls in der ß-Zelle werden Metaboliten gebildet, die die Insulinsekretion stimulieren.

Die Glucose wird zum einen über den Embden - Meyerhof-Weg, zum anderen über den Pentosephosphatshunt (PPS) abgebaut (16, 17, 18, 19).

Der Metabolismus der Glucose über den Glykolyseweg ist von Bedeutung für die insulinfreisetzende Wirkung der Glucose selbst.
Dafür sprechen folgende Tatsachen:
Die Aktivität des glykolytischen Abbaus korreliert mit der durch Glucose induzierten Insulinfreisetzung (16, 20).
Durch die Blockade der Glykolyse durch 2 - Desoxyglucose (21, 22, 23), das den Reaktionsschritt von Glucose - 6 - phosphat zu Fructose - 6 - phosphat unterbindet, findet eine Insulinsekretion nicht statt.
Zu einer Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion führt auch der Zusatz von Jodacetat, welches die Glycerinaldehydphosphat - Dehydrogenase, also die Bildung von 1,3-Diphosphoglycerat, verhindert (24).
Selbst die Zugabe von Pyruvat, das die Energieversorgung durch ATP - Produktion gewährleistet, ohne die Insulinsekretion zu beeinflussen, kann die Hemmwirkung des Jodacetat nicht aufheben (25, 26, 27).
Die Glykolyse spielt demzufolge eine bedeutende Rolle bei der Stimulation der Insulinfreisetzung.

Viele Autoren messen auch dem Abbauweg des Pentosephosphatshunt für die Insulinfreisetzung große Bedeutung zu, wenngleich er quantitativ gesehen den kleineren Anteil am Glucoseabbau ausmacht (28).

So fanden Ammon und Steinke (29, 30), daß eine Hemmung des PPS in den Langerhansschen Inseln, die durch 6-Aminonicotinamid (6-AN) - einem Antimetaboliten der Pyridinnukleotidsynthese (vorwiegend des NADPH) - hervorgerufen wird, mit einer Hemmung der durch Glucose induzierbaren Insulinsekretion einhergeht.
Einen weiteren Hinweis für die mögliche Bedeutung des Glucosemetabolismus über den Pentosephosphatshunt für den Insulinsekretionsvorgang lieferten Ammon und Mitarbeiter (31, 32): Sowohl der prozentuale Anteil des PPS an der Glucoseoxidation, als auch die absolute Menge Glucose, die über den PPS verstoffwechselt wird, sind abhängig von der eingesetzten Glucosemenge, was ebenso für die sezernierte Insulinmenge gilt.

Wird die Aktivität des PPS durch Chlorpromazin vermindert, wie Ammon, Orci, Steinke (33) berichten, so bewirkt dies wiederum eine Abnahme der durch Glucose stimulierten Insulinfreisetzung.
Die Tatsache, daß Ribosen die Insulinsekretion stimulieren (34), diese jedoch nicht über die Glykolyse, sondern über den PPS abgebaut werden, spricht ebenfalls für die Bedeutung des PPS für das Sekretionsgeschehen.
Weitere Befunde aus unserem Arbeitskreis (35) bestärken diese Hypothese:
Bei den Untersuchungen des Einflusses von exogenem Insulin auf den Pentosephosphatshunt an isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte ergab sich eine Abnahme der Glucoseoxidation über den PPS in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge an exogenem Insulin.

1.1.3. Pyridinnukleotide und ihre Beziehung zur Insulinsekretion

Stellt man sich nun die Frage, welche Metaboliten des Glucoseabbaus, sei es nun aus der Glykolyse, sei es aus dem Pentosephosphatshunt, für die Insulinsekretion eine Rolle spielen, so ist die Feststellung von Panten et al. (36) interessant: Diese Autoren zeigten, daß die glucoseinduzierte Insulinsekretion mit einem Anstieg der Fluoreszenz der reduzierten Pyridinnukleotide, d.h. der Summe aus NADH und NADPH, einhergeht. Daraus läßt sich nicht entnehmen, ob es sich in erster Linie um einen Anstieg des NADHs, das der Glykolyse und dem Citratcyclus entstammt, oder des NADPHs, das im PPS an zwei Stellen, bei der Umwandlung von Glucose-6-phosphat in 6-Phosphogluconat und von 6-Phosphogluconat in Ribulose-5-phosphat, entsteht, handelt.

Weitere Untersuchungen von Ammon et al. (37) zeigten anhand einer Meßmethode, die die getrennte Bestimmung der Pyridinnukleotide ermöglicht, daß insbesondere eine Änderung des NADPH - Gehalts der Langerhansschen Insel mit der Insulinsekretion in Zusammenhang zu bringen ist. Sie stellten fest, daß der NADPH/NADP-Quotient der Pankreasinsel von der Glucosekonzentration abhängig ist und diese wiederum mit der freigesetzten Insulinmenge korreliert.

Ein weiterer Befund unseres Arbeitskreises deutet darauf hin, daß dem NADPH eine Bedeutung für die Insulinfreisetzung zuzuschreiben ist:
Wird bei isolierten Pankreasinseln von Ratten im Hungerzustand der NADPH / NADP - Quotient bestimmt, so zeigt sich, daß dieser im Vergleich zu normal gefütterten Tieren unter dem Einfluß von Glucose weniger ansteigt, und daß ebenso die glucoseinduzierte Insulinsekretion erniedrigt ist (38).
Entscheidende Hinweise, daß zwischen der Bildung von NADPH im PPS und der sezernierten Insulinmenge aus der ß-Zelle ein Zusammenhang besteht, liefern auch Untersuchungen mit Methylenblau, welches NADPH (jedoch nicht NADH) in der Zelle zu NADP oxidiert.
Der Zusatz von Methylenblau ins Inkubationsmedium der isolierten Insel bewirkt konzentrationsabhängig eine Abnahme (39, 40) des durch Glucose und Glucose plus Leucin erhöhten NADPH / NADP - Quotienten (41).
Ebenso wird die stimulierte Insulinsekretion durch Zugabe von Methylenblau vermindert (42).
Auch Versuche mit zugesetztem exogenem Insulin zur isolierten Pankreasinsel bestärken die These, daß dem NADPH eine Bedeutung im Hinblick auf die Insulinfreisetzung beizumessen ist. Parallel zur Abnahme der Aktivität des PPS ist auch unter dem Einfluß des negativen feedback des exogenen Insulins eine Abnahme des NADPH / NADP - Quotienten und der glucoseinduzierten Insulinsekretion festzustellen (35, 44, 45).

Zawalich et al. (46) führten Untersuchungen mit Nicotinamid, einem Substrat der Pyridinnukleotidsynthese, durch. Bei Zugabe von Nicotinamid in das Perifusionsmedium war eine dosisabhängige Potenzierung der glucoseinduzierten Insulinsekretion festzustellen.
Diese Ergebnisse unterstreichen die mögliche Bedeutung der Pyridinnukleotide für die Insulinfreisetzung.

Zusammenfassend kann man zu dem Schluß kommen, daß alle diese Ergebnisse die Annahme bestärken, daß in der Langerhansschen Insel eine Beziehung zwischen der Insulinsekretion und dem Pentosephosphatshunt (47, 48), bzw. zwischen der Insulinsekretion und dem NADPH / NADP - Quotienten besteht (49).

1.1.4. Vergleich des Glucosemetabolismus Langerhansscher Inseln von Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten

Führt man sich die verschiedenen Faktoren vor Augen, die die Langerhanssche Insel zur Sekretion von Insulin anregen, so liegt der Gedanke nahe, ob nicht an einer oder an mehreren Stellen ein Defekt oder ein Unterschied in der Funktion der ß-Zellen von Erwachsenen und Foeten oder Neugeborenen vorliegen muß, der zu der teilweisen Sekretionsinsuffizienz im foetalen Stadium (5) führt.

Eine mögliche Ursache wäre, daß die Pankreasinsel der Foeten noch nicht in der Lage ist. das Glucosemolekül als Ganzes als Stimulans zu erkennen.
Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß der Glucoseabbau der foetalen ß-Zelle an irgendeiner Stelle noch nicht voll funktionsfähig ist.
Liegt der Defekt im Embden-Meyerhof-Abbauweg der Glucose, der unter anderem zur Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten des NADH dient, so könnte sich dies bei der Messung des NADH/NAD - Quotienten während der Stimulation mit Glucose feststellen lassen.
Liegt der Defekt dagegen im Abbau der Glucose über den Pentosephosphatshunt begründet, der zur Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH dient, so bringt vielleicht die Messung des NADPH/NADP - Quotienten aufschlußreiche Ergebnisse.

Eine weitere Möglichkeit, die Aktivität des PPS zu bestimmen, besteht darin, die Glucoseoxidation mit Hilfe ^{14}C-markierter Glucose zu messen.
Heinze und Steinke (9) berichten, daß in vitro bei Verwendung von 1-^{14}C- und 6-^{14}C-Glucose (16,7 mM Glucose im Medium) die Oxidation 1-^{14}C-markierter Glucose bei Inseln von Rattenfoeten etwa gleich groß bis etwas niedriger ist als die Oxidation von 6-^{14}C-markierter Glucose.
Bei erwachsenen Ratten dagegen ist die 1-^{14}C-Oxidation wesentlich größer als die 6-^{14}C-Glucoseoxidation.
Ein ähnliches Ergebnis findet sich auch bei neugeborenen Ratten am fünften Tag nach der Geburt.
Aufgrund dieser Ergebnisse vermuten die Autoren, daß Inseln von Foeten die Glucose nicht über den PPS verstoffwechseln.

Von Katz und Wood (50) wurde eine Formel aufgestellt, mit der es unter Zuhilfenahme der THO-Bildung sowie der $^{14}CO_2$-Bildung aus 1-^{14}C- und 6-^{14}C-Glucose annähernd möglich ist, sowohl die prozentuale als auch die absolute Rate der Glucoseoxidation über den Pentosephosphatshunt zu ermitteln.
In neuesten Untersuchungen unseres Arbeitskreises wurde diese Methode zur Bestimmung der Glucoseoxidation bei foetalen, fünf Tage alten neugeborenen und trächtigen Ratten angewandt (51).

Bei den isolierten Langerhansschen Inseln von Müttern und Neugeborenen (5 Tage p.p.) führt die Erhöhung der Glucosekonzentration im Inkubationsmedium von 5,6 auf 16,7 mM zu einem deutlichen Anstieg der $^{14}CO_2$-Bildung aus 6-^{14}C-Glucose. Diese Befunde sprechen dafür, daß bei trächtigen und bei fünf Tage alten neugeborenen Ratten, die bereits die Fähigkeit zur glucoseinduzierten Insulinsekretion besitzen, eine dosisabhängige Oxidation der Glucose über die Glykolyse stattfindet.

Im Gegensatz dazu findet sich bei Inseln von foetalen Ratten bei der Steigerung der Glucosekonzentration von 5,6 auf 16,7 mM keine Zunahme der $^{14}CO_2$-Bildung aus 6-^{14}C-Glucose.

Daraus kann man die Annahme ableiten, daß bei foetalen Inseln eine Erhöhung der Glucosekonzentration nicht zu einer Steigerung der Glucoseoxidation über die Glykolyse führt.

Die Untersuchungen bezüglich der Glucoseoxidation über den PPS wiesen ebenfalls Unterschiede zwischen Müttern und Neugeborenen einerseits und Foeten andererseits auf.

Bei der Erhöhung der Glucosekonzentration kommt es bei Inseln von erwachsenen und von fünf Tage alten neugeborenen Ratten sowohl zu einer Zunahme des prozentualen Anteils des PPS, gemessen an der Gesamtoxidation, als auch zu einer Zunahme der absoluten Menge an Glucose, die über den PPS verstoffwechselt wird.

Ganz anders dagegen verhalten sich die Inseln foetaler Ratten. Hier führt die Erhöhung der Glucosekonzentration weder zur Zunahme der absoluten Rate noch des prozentualen Anteils des PPS an der Glucoseoxidation.
Daraus läßt sich nun die Vermutung ableiten, daß die Glucoseoxidation über die Glykolyse und den PPS offenbar erst einige Tage nach der Geburt einsetzt und hierin eine Ursache für die fehlende oder geringfügige Sekretion von Insulin zu suchen sein könnte.

1.1.5. Alter und Insulinsekretion

Spannt man nun den Bogen über die gesamte Lebenszeit und wendet den Blick vom foetalen, noch nicht voll entwickelten Stadium hin zum alternden Lebewesen, so lassen sich hier, wie von einigen Autoren berichtet wird, gewisse Parallelen hinsichtlich der Funktionsfähigkeit der Langerhansschen Inseln ziehen.
Jedoch bergen die verschiedenen Untersuchungsergebnisse eine größere Widersprüchlichkeit in sich.

Wiederholt wurde über eine Verschlechterung der Glucosetoleranz im Alter bei Menschen (52, 53, 54, 55) berichtet. Auch bei Ratten wurde von mehreren Seiten mit zunehmendem Alter eine herabgesetzte Glucosetoleranz im Vergleich zu jüngeren Tieren sowohl bei intraperitonealer (56), als auch bei oraler Glucoseverabreichung (57, 58) festgestellt.

Bezüglich der Auswirkungen des Alters auf die Plasmainsulinantwort nach Glucosebelastung findet man gegensätzliche Positionen:
Die meisten Autoren berichten aufgrund ihrer in vivo-Experimente über normale oder erhöhte Werte, verglichen mit jüngeren Personen.
Bracho-Romero und Reaven (57) finden einen Anstieg des Plasmainsulins nach oraler Glucosebelastung bei der Ratte, Woldow et al. (59) kommen ebenfalls zu einem solchen Ergebnis beim Menschen, Yoshino et al. (60) stellen unveränderte Insulinspiegel fest.
Im Gegensatz dazu kommen andere Autorengruppen bei i.v. Verabreichung von Glucose bei älteren Personen zu dem Schluß, daß die Insulinantwort im Serum erniedrigt oder verzögert ist (61).
Zeytinoglu et al. (62) fanden nach oraler Glucosegabe bei Menschen höheren Alters ebenfalls eine verzögerte Insulinausschüttung ins Serum.

Diese Resultate lassen jedoch noch nicht auf eine normale oder anomale ß-Zellfunktion schließen, da die Plasmainsulinkonzentration nach Glucosegabe nicht nur von der sekretorischen Fähigkeit der ß-Zelle selbst, sondern auch von anderen Faktoren wie der Insulinumsatzrate, der gesamten ß-Zellmasse, der vorherrschenden Plasmaglucosekonzentration etc. abhängt.

Auch waren die Auswahlkriterien bezüglich der Versuchspersonen in den verschiedenen Experimenten nicht einheitlich, was z.B. Altersgrenze, Diabetes in der Familie, diätetische Vorbereitung, zeitliche Plasma-Entnahme etc. anbelangt.
Bei Untersuchungen an isolierten Langerhansschen Inseln fallen einige der für in vivo-Systeme typischen Variablen weg.
Ammon (63) stellte bei Versuchen an Inseln von zwei Jahre alten Mäusen einen Abfall der glucoseinduzierten Insulinsekretion im Vergleich zu jungen fest.
Coddling et al. (64) konnten diese Ergebnisse an isolierten Inseln der Ratte bestätigen.
Auch die Experimente von Reaven et al. (65) deuten in dieselbe Richtung, daß bei der ß-Zelle der Ratte im Alter eine gewisse Insuffizienz der Insulinsekretion bei Glucosestimulation vorliegt.
Aufgrund dieser Befunde drängt sich die Frage auf, ob die Ursache hierfür eventuell, wie dies schon beim foetalen Stadium vermutet wurde, in einem veränderten Glucosemetabolismus zu suchen ist.
Bei der Untersuchung der Glucoseoxidation finden sich folgende Ergebnisse:
Neueste Experimente an alten und jungen Ratten (66) ergeben in Gegenwart von 16,7 mM Glucose eine signifikante Erniedrigung der Glucoseoxidation im Alter sowohl bei Verwendung von 1-^{14}C- als auch von 6-^{14}C-Glucose.

Von anderer Seite jedoch wurde bei Untersuchungen im Fettgewebe der Ratte nur über ein Absinken der $^{14}CO_2$-Produktion aus 1-^{14}C-Glucose mit zunehmendem Alter berichtet (67), während die 6-^{14}C-Glucoseoxidation im Alter konstant bleibt im Vergleich zu jüngeren Tieren (68).

Jüngste Untersuchungen unseres Arbeitskreises (69) konnten in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte jedoch keinen Abfall der Oxidation von 6-^{14}C-Glucose beobachten. Auch die Oxidation von 1-^{14}C-Glucose zeigte im Vergleich zu jüngeren Tieren nur eine tendenzielle Erniedrigung.
Diese Ergebnisse lassen die Schlußfolgerung zu, daß in der ß-Zelle der alten Ratte die Glykolyse und der Citratcyclus vermutlich normal ablaufen, während die Glucoseoxidation via Pentosephosphatshunt vermindert ist.
Diese These wird durch Messungen des NADPH-Gehaltes an Inseln alter Mäuse (63) unterstützt, die ergaben, daß dieser bei Glucosestimulation nicht erhöht werden kann.
Untersuchungen diesbezüglich bei der Ratte liegen noch nicht vor.

1.1.6. Leucin, Alter und Insulinsekretion

Der stimulierende Effekt der Aminosäure Leucin auf die Insulinsekretion wurde von verschiedenen Autoren nachgewiesen (70, 71, 72).
Uneinigkeit herrscht allerdings darüber, ob Leucin die Anwesenheit von Glucose benötigt, um seine insulinfreisetzende Wirkung zu entfalten.
Milner (73) berichtete, daß Leucin die einzige essentielle Aminosäure sei, die in Abwesenheit von Glucose im Extrazellulärraum die ß-Zelle zur Insulinsekretion anregt. Auch von Basabe et al. (74) wurde dies bestätigt.
Malaisse et al. (75) vertreten jedoch die gegenteilige Meinung. Sie finden nur eine Steigerung der insulinotropen Wirkung der Glucose durch Leucin. Diese Feststellung wurde von verschiedener Seite bekräftigt (73,74,76).
Panten et al. (36) berichten sogar über einen hemmenden Einfluß von Glucose auf die Insulinfreisetzende Wirkung von Leucin.
Dies könnte mit der Tatsache in Verbindung gebracht werden, daß das Leucinmolekül in der ß-Zelle verstoffwechselt wird und Glucose dosisabhängig die Leucinoxidation verringert (77).
Der Leucinabbau in der ß-Zelle ist also möglicherweise Voraussetzung für die insulinotrope Wirkung. Dafür spricht auch die Tatsache, daß α-KIC, ein Abbauprodukt des Leucins, ebenfalls die Insulinsekretion stimuliert (78).

Es stellt sich nun die Frage, auf welche Weise Glucose - sofern sie für die insulinfreisetzende Wirkung des Leucins von Bedeutung ist - an diesem Sekretionsprozess beteiligt ist.
Es besteht die Möglichkeit, daß für den sekretionsstimulierenden Effekt von Leucin Metaboliten des Glucoseabbaus notwendig sind. Oder aber Leucin stellt über den eigenen Stoffwechselweg Produkte zur Verfügung, die die insulinotrope Wirkung der Glucose oder des Leucins verstärken.
Hinweise auf die gegenseitige Beeinflussung der Stoffwechselwege von Leucin und Glucose lieferten Gylfe und Sehlin (79):
L-Leucin hat keinen Einfluß auf die Glykolyse, was durch Messungen der $^{3}H_2O$-Produktion festgestellt wurde, stimuliert aber die Bildung von $^{14}CO_2$ aus D-(U-^{14}C)-Glucose (79).
Neueste Untersuchungen unseres Labors ergaben jedoch, daß nach Leucin die Bildung von $^{14}CO_2$ und THO aus 1-^{14}C- und 6-^{14}C- sowie 5-^{3}H-Glucose nicht verändert war (69). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Leucin keinen Einfluß auf den PPS hat.
Allerdings war aber der NADPH-Gehalt, dessen wichtigste Quelle der PPS darstellt, nach 10 mM Leucin in Gegenwart von 2 mg/ml Glucose signifikant erhöht (42).
Panten et al. (36) stellten ebenfalls eine Zunahme der Pyridinnukleotidfluoreszenz unter dem Einfluß von Leucin fest.

Möglicherweise werden diese Reduktionsäquivalente aus einer anderen Quelle bereitgestellt.
Dafür, daß den reduzierten Pyridinnukleotiden eine Bedeutung bei der Wirkung des Leucins auf die Insulinsekretion zukommt, spricht auch die Tatsache, daß Oxidantien des NADPH, wie z.B. Methylenblau, die durch Leucin stimulierte Insulinfreisetzung hemmen (42).
In Verbindung mit den Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit über den Einfluß von Glucose auf den NADPH/NADP-Quotienten im Alter war die Fragestellung von Interesse, ob Leucin im Zusammenhang mit Glucose auch im Alter eine Auswirkung auf den insulären NADPH-Gehalt hat.

1.2. Fragestellung

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, die Beziehung zwischen der Insulinsekretion und dem Redoxzustand der Pyridinnukleotide in den isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte in den verschiedenen Altersstufen zu untersuchen:

1. Einfluß von verschiedenen Glucosekonzentrationen auf die Insulinsekretion bei Erwachsenen, fünf Tage alten Neugeborenen und Foeten.

Verschiedene Arbeitsgruppen hatten bereits eine gewisse Insulinsekretionsinsuffizienz der ß-Zelle bei der Stimulation mit Glucose während der Perinatalzeit nachgewiesen (8,9). Ein Teil dieser Arbeit sollte sich nun mit der Frage beschäftigen, ob sich diese Aussage im direkten Vergleich der Insulinsekretion erwachsener, fünf Tage alter neugeborener und foetaler Inseln quantitativ gesehen bestätigen läßt.

2. Einfluß von verschiedenen Glucosekonzentrationen auf den insulären Redoxzustand der Pyridinnukleotide (NADPH - NADP und NADH - NAD) bei Erwachsenen, fünf Tage alten Neugeborenen und Foeten.

Einen Beitrag zur Klärung der Frage, inwieweit die Ursache für das abgeschwächte Sekretionsvermögen der foetalen Inseln im Glucosemetabolismus zu suchen ist, sollte durch die Messung des insulären Redoxzustandes der Pyridinnukleotide geleistet werden.

Die Messung des NADPH/NADP - Quotienten sollte durchgeführt werden, um eventuelle Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit des PPS ziehen zu können, da diese vermutlich beim Foeten eingeschränkt ist (51).
Die Bestimmung des NADH/NAD - Quotienten sollte einen Hinweis liefern, inwieweit im perinatalen Stadium der Ratte über die Glykolyse und den Citratcyclus die Bildung von Reduktionsäquivalenten erfolgt.
3. Einfluß von verschiedenen Glucosekonzentrationen auf den insulären Redoxzustand der Pyridinnukleotide bei erwachsenen (drei Monate alten) im Vergleich zu zwei Jahre alten Ratten.
Die Messung des NADPH- und NADP- Gehaltes von Inseln junger und alter Ratten sollte einen weiteren Hinweis liefern, ob die im Alter verminderte Insulinsekretion mit einer entsprechenden Änderung des NADPH - NADP - Systems einhergeht.
4. Einfluß von Leucin und Glucose auf den insulären Redoxzustand der Pyridinnukleotide bei erwachsenen (drei Monate alten) im Vergleich zu zwei Jahre alten Ratten.
Als Ergänzung der Messungen des NADPH/NADP - Quotienten im direkten Vergleich von Alt und Jung sollte nun noch festgestellt werden, ob auch im Alter durch Leucin eine Änderung dieses Quotienten hervorgerufen wird.

2. Material und Methodik

2.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts verwendet. Die erwachsenen Tiere hatten ein Körpergewicht von 200 - 300g. Sie erhielten Standardtrockenfutter der Firma Altromin, Lage/Lippe, und Trinkwasser ad libitum. Die Haltung erfolgte bei ca. 24 °C Raumtemperatur im lichtkontrollierten Raum.
Für die vergleichenden Untersuchungen alter und junger Tiere wurden Ratten mit einem Alter von zwei Jahren bzw. drei Monaten verwendet. Die Haltung erfolgte ebenfalls unter den oben angegebenen Bedingungen.

Die Zucht von Foeten und Neugeborenen:
Die Zucht für die Bereitstellung der foetalen oder neugeborenen Ratten wurde nach der intermittierend monogamen Methode (82) durchgeführt, d.h. die Verpaarung erfolgte 1:1, wobei je ein männliches und ein weibliches Tier nur während des Deckaktes zusammen sind.
Die Zuchtreife beider Geschlechter liegt um den 60.-65. Tag. Das Gewicht der Weibchen beträgt dann 180 - 220g, das der Männchen 240 - 280g (82).
Bei den hier verwendeten Tieren lag das Körpergewicht der Weibchen bei 200 - 250g, das der Männchen über 250g.
Der Brunstzyklus der Ratten umfaßt im Normalfall vier bis fünf Tage, wovon zwei Tage auf die Brunst und zwei bis drei Tage auf ein Ruhestadium fallen. Der Deckakt dauert gewöhnlich 15 bis 20 Minuten (83).

Es genügte also, die Paarungspartner in der Brunstzeit während 24 Stunden zusammen zu setzen, um damit den genauen Tag der Aufnahme des Weibchens festlegen zu können.
Drei bis acht Stunden nach der Begattung bildet sich, unabhängig davon, ob sie auch erfolgreich war, ein Vaginalpfropf aus. Der Erfolg liegt jedoch bei 97%. Der Vaginalpfropf fällt dann heraus (83).
Um diesen sicher wieder aufzufinden, wurden die Paarungspartner in Makrolonkäfige gesetzt, deren Boden nicht mit Sägemehl bedeckt war, sondern mit weißem Papier, das in 1 cm Höhe von einem Drahtgitter überspannt war. Auf dem Papier war der gelblich bis rote Vaginalpfropf sehr gut zu erkennen.
Nach den 24 Stunden wurden die Weibchen wieder von den Männchen getrennt. Dies war der Tag 1 der Schwangerschaft, vgl. (9,84). Die Tragezeit der Ratten beträgt 21 bis 23 Tage (83).

Die eine Hälfte der Schwangeren ließ man auf natürliche Weise gebären, vgl. (9,84). Die Jungen dieser Würfe blieben bis zum Alter von fünf Tagen bei der Mutter. Dann wurden sie für die Versuche mit Neugeborenen verwendet. Sie hatten ein durchschnittliches Gewicht von 10 bis 11g.
Bei der anderen Hälfte der Schwangeren wurden die Foeten am 22. Tag durch Schnittentbindung dem Uterus entnommen, vgl. (9,84). Deren Gewicht betrug zwischen 4,5 und 5,5g.
Die Anzahl der Jungtiere pro Wurf lag bei etwa 8 bis 12, vgl.(83). Zu kleine Würfe wurden nicht verwendet.

Durchführung der Schnittentbindung:

In Äthernarkose wurde die Bauchdecke der schwangeren Ratte mit einem Längs- und vier Querschnitten geöffnet. Sodann wurden die beiden Hörner des Uterus vorsichtig herausgezogen und so ausgebreitet, daß die in einer Reihe liegenden Foeten gut sichtbar wurden.
Nun schnitt man von der Mitte des Uterus aus auf der den Blutgefäßen abgewandten Seite die Uterushaut auf und konnte nun die Foeten einzeln entnehmen und abnabeln. In diesem Augenblick setzte die selbsttätige Atmung der Tiere ein.
Es wurde noch kurz das Gewicht der Tiere und eines Mutterkuchens bestimmt, welcher etwa ein Zehntel der Tiere wiegt.

2.2. Geräte

Schüttelwasserbad, Firma Köttermann
Stereomikroskop Nikon SM 6 mit Durchlichtuntersatz
und Okularpaar mit 20facher Vergrößerung
Heraeus-Christ Kühlzentrifuge UJ II KS
Fluoripoint-Spectrofluorimeter, Firma Baird Atomic
Spectralphotometer PM 6, Firma Zeiss
Tischcomputer Olivetti P 602
pH - Meter H 5, Beckmann
Whirlmix, Retsch
Eppendorf - Reaktionsgefäße Nr. 3810
Eppendorf - Zentrifuge Nr. 5413
Automatischer Gamma-Zähler Modell 4233,
Firma Nuclear Chicago Corp. Illinois, U.S.A.
Gefriertrocknungsanlage Beta
Firma Christ GmbH, Osterode

2.3. Chemikalien und Enzyme

Adenosin-5-diphosphat	Boehringer Mannheim
Alkohol-Dehydrogenase	" "
Collagenase I (126-196 µE/mg)	Worthington Biochem. Corp. Freehold, U.S.A.
Collagenase II (0,7 U/mg)	Serva Heidelberg

α-D-Glucose	Serva Heidelberg
Glucose-6-phosphat	Boehringer Mannheim
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	" "
Glutamat- Dehydrogenase	" "
INSIK - 1(R) =	Isotopendienst West
Insulin-Radioimmunoassay-Kit	Sprendlingen
Insulin-Antikörper	Novo Lab., Kopenhagen
α-Ketoglutarsäure	Boehringer Mannheim
Lactat-Dehydrogenase	" "
NAD	" "
NADH	" "
NADP	" "
NADPH	" "
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	" "
Ratteninsulin	Novo Lab., Kopenhagen
Rinderserumalbumin I (96-99%)	Sigma Chemical Comp. St.Louis
Rinderserumalbumin II	Behringwerke Marburg
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan	Boehringer Mannheim

Alle hier nicht genannten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt in der jeweils reinsten Form (p.a.) bezogen.

2.4. Nähr- und Reagenzlösungen

2.4.1. Hanks' Lösung

Stammlösung:

NaCl		80,00	g
KCl		4,00	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$		0,60	g
KH_2PO_4		0,60	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		2,00	g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$		1,85	g
Aqua bidest.	ad	1000	ml

Vor Gebrauch mußte diese Stammlösung mit Aqua bidest. 1:10 verdünnt und der pH-Wert mit $NaHCO_3$-Lösung auf 7,35 eingestellt werden.
Für eine bessere Substratversorgung wurden 0,54 mg/ml Glucose zugesetzt.

2.4.2. Krebs-Ringer-Bicarbonat (KRB)-Lösung

Nach der Originalvorschrift von Umbreit et al. (85) setzt sich die verwendete KRB-Lösung wie folgt zusammen:

NaCl-Lsg.	0,90% = 154 mM	100 Teile
KCl-Lsg.	1,15% = 154 mM	4 "
$CaCl_2$-Lsg.	1,22% = 154 mM	3 "
KH_2PO_4-Lsg.	2,11% = 154 mM	1 Teil
$MgSO_4$-Lsg.	3,82% = 154 mM	1 "
$NaHCO_3$-Lsg.	1,30% = 154 mM	21 Teile

Um diese Lösung jederzeit frisch herzustellen, wurden aus praktischen Gründen drei getrennte Lösungen folgender Zusammensetzung angefertigt, die dann bei 4°C aufbewahrt wurden.

Lösung A :

NaCl		69,20	g
KCl		3,61	g
KH_2PO_4		1,62	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		2,93	g
Aqua bidest.	ad	1000	ml

Lösung B :

$NaHCO_3$		21,10	g
Aqua bidest.	ad	1000	ml

Lösung C :

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$		3,73	g
Aqua bidest.	ad	1000	ml

Vor Gebrauch wurden die Stammlösungen folgendermaßen gemischt:

Lösung A	10 Teile
Lösung B	10 "
Lösung C	10 "
Aqua bidest.	70 "

Vor der Inkubation wurde die KRB-Lösung 10 min. mit Carbogen (95% O_2 und 5% CO_2) begast, mit 2% Rinder-serumalbumin I versetzt und auf pH 7,35 eingestellt. Es mußte nur noch die entsprechende Menge Substrat dem Medium zugesetzt werden.

2.4.3. Cycling-Reagenz für die Bestimmung von NADPH und NADP

Zusammensetzung:		
Trispuffer (1 M, pH 8,0)		10,0 ml
α-Ketoglutaratlösung (1 M)		0,5 ml
G-6-P-Lösung (0,1 M)		1,0 ml
ADP-Lösung (0,1 M)		0,1 ml
Aqua bidest.	ad	100,0 ml

Diese Lösung wurde portionsweise zu je 5,0 ml eingefroren. Nach dem Auftauen setzte man kurz vor Gebrauch einer Portion jeweils 50 µl G-6-P-Dehydrogenase und 100 µl Gl-Dehydrogenase zu.

2.4.4. Phosphogluconat - Reagenz

Zusammensetzung:		
Trispuffer (1 M, pH 8,0)		2,0 ml
Ammoniumacetatlsg. (5 M)		0,6 ml
EDTA-Lsg. (0,1 M)		0,1 ml
Albumin(II)-Lsg. (10%)		0,2 ml
6-PG-Dehydrogenase		0,2 ml
NADP-Lsg. (1,6 mg/ml)		1,0 ml
Aqua bidest.	ad	100,0 ml

Diese Lösung ist bei Zimmertemperatur etwa 3 bis 4 Stunden haltbar.

2.4.5. Cycling - Reagenz für die Bestimmung von NADH und NAD

Zusammensetzung:

Trispuffer (1M, pH 8,4)		20,0 ml
α-Ketoglutaratlösung (1M)		0,5 ml
Lactatlösung (1M, pH 7)		10,0 ml
ADP-Lösung (0,1M)		0,3 ml
NH_4-acetatlösung (5M)		1,0 ml
Aqua bidest.	ad	100,0 ml

Von dieser Lösung wurden Portionen zu je 5,0 ml eingefroren. Kurz vor Gebrauch setzte man nach dem Auftauen jeweils 0,2 ml Glutamat-Dehydrogenase und und 5 µl Lactat-Dehydrogenase zu.

2.4.6. Pyruvat - Reagenz

Zusammensetzung:

Imidazolpuffer (1M, pH 6,2)		0,8 ml
NADH-Lösung (5mM)		0,1 ml
Lactat-Dehydrogenase		1 µl
Aqua bidest.	ad	10,0 ml

Das Reagenz sollte erst unmittelbar vor Gebrauch hergestellt werden.

2.5. Standardlösungen und deren Gehaltsbestimmung

2.5.1. NADPH - Standard

Zusammensetzung:

NADPH (5 nmol)		5,5 mg
Carbonatpuffer (pH 10,6)		0,9 ml

Zusammensetzung des Puffers:

Na_2CO_3		850,0 mg
$NaHCO_3$		170,0 mg
Aqua bidest.	ad	100,0 ml

Gehaltsbestimmung des Standards:

Das Prinzip der Gehaltsbestimmung (86) beruht auf einer photometrisch meßbaren enzymatischen Reaktion:

$$\text{NADPH} + \alpha\text{-Ketoglutarat} \xrightarrow{\text{Gl-DH}} \text{NADP}^+ + \text{Glutamat} + H_2O$$

Der durch die Umwandlung von NADPH in $NADP^+$ verursachte Extinktionsabfall wird bei 340 nm gemessen.

Zur praktischen Messung werden in die Küvette pipettiert:

Standardlösung	60 µl
Puffergemisch	3 ml

Zusammensetzung des Puffergemisches:

Trispuffer (1 M, pH 8,0)		1 ml
α-Ketoglutarsäurelösung (146 mg/ml)		10 µl
Ammoniumacetatlösung (385 mg/ml)		50 µl
Aqua bidest.	ad	10 ml

Nach Zugabe von 6 µl Glutamat-Dehydrogenase wird der Stillstand der Reaktion in der Küvette abgewartet und die Extinktionsabnahme ΔE bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.
Aus dieser Standardlösung wird für jede NADPH - Bestimmung eine Verdünnungsreihe hergestellt, um bei der Analyse ein direktes Bezugssystem zu haben. Konzentrationen von 2,0 - 0,125 pM NADPH / 20 µl erwiesen sich als sinnvoll.

Zunächst werden 20 µl der Standardlösung ad 10,0 ml mit Aqua bidest. verdünnt = Lösung A.

Dann werden x µl dieser Lösung A ad 10,0 ml mit einer NaOH / Cystein - Lösung (40 mM / 0,5 mM) verdünnt = Lösung B (= 2,0 pmol NADPH in 20 µl).

Berechnung von x :

$$x = \frac{0{,}615 \cdot 100}{\Delta E} \ \mu l$$

Verdünnungsreihe:

Lösung:	pmol NADPH in 20 µl:	Herstellung:
C	1,0	0,3 ml B + 0,3 ml NaOH/Cystein
D	0,5	0,3 ml C + 0,3 ml "
E	0,25	0,3 ml D + 0,3 ml "
F	0,125	0,3 ml E + 0,3 ml "

Als Leerwerte dienten je 20 µl NaOH / Cystein.

2.5.2. NADP - Standard

Zusammensetzung:

NADP-Lösung (80 mg/ml, 100 mM)		0,1 ml
Aqua bidest.	ad	10,0 ml

Gehaltsbestimmung des Standards:
Sie basiert auf folgender Reaktion (86) :

$$NADP^+ + \text{Glucose-6-phosphat} \xrightarrow{\text{G-6-P-DH}} \text{6-PG} + NADPH + H^+$$

Das Entstehen von NADPH aus $NADP^+$ ist mit einem Extinktionsanstieg verbunden, der bei 340 nm gemessen wird.

Dazu werden direkt in die Küvette pipettiert:

Standardlösung	0,3 ml
Puffergemisch	3,0 ml

Zusammensetzung des Puffergemisches:

Trispuffer (1 M, pH 8,0)		1,0 ml
G-6-P-Lösung (72 mg/ml)		0,1 ml
Aqua bidest.	ad	10,0 ml

Nach Zugabe von 15 µl Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wird nach Abwarten des Reaktionsstillstandes bei der Wellenlänge von 340 nm der Extinktionsanstieg ΔE gemessen.

Die Standardlösung wird in Portionen zu je 0,5 ml eingefroren und ist so ca. 4 Wochen haltbar.

Bei jeder NADP-Bestimmung wird eine Verdünnungsreihe als Bezugssystem hergestellt und mitanalysiert. Sinnvollerweise werden Konzentrationen von 2,0 - 0,125 pM NADP / 20 µl hergestellt.

Dazu werden x ml Standardlösung ad 10 ml mit Aqua bidest. verdünnt = Lösung A

Berechnung von x :

$$x = \frac{0{,}56 \cdot 100}{\Delta E} \mu l$$

Für weitere Verdünnungen wird ein Gemisch von 2 Teilen NaOH / Cystein - Lösung (40 mM / 0,5 mM) und 20 Teilen H_2SO_4 / Na_2SO_4 - Lösung (0,1 M / 20 mM) verwendet.

Verdünnungsreihe:

Lösung:	pmol NADP in 20 µl:	Herstellung:
B	2,0	0,1 ml A ad 10,0 ml Mischung (s.
C	1,5	0,75ml B + 0,25ml "
D	1,0	0,5 ml B + 0,5 ml "
E	0,5	0,5 ml D + 0,5 ml "
F	0,25	0,5 ml E + 0,5 ml "
G	0,125	0,5 ml F + 0,5 ml "

Als Leerwerte dienten je 20 µl der NaOH / Cystein / H_2SO_4 / Na_2SO_4 - Mischung.

2.5.3. NADH - Standard

Zusammensetzung:

NADH (5mmol)	5,2 mg
Carbonatpuffer (0,1M, pH 10,6)	1,5 ml

Diese Lösung wird 10 Min. bei 60°C im Wasserbad erhitzt und anschließend im Kühlschrank aufbewahrt.

Gehaltsbestimmung des Standards:

Der Methodik liegt folgende Reaktion zugrunde (86):

$$NADH + Pyruvat + H^+ \xrightarrow{LDH} Lactat + NAD^+$$

Die Umsetzung von NADH zu NAD^+ ist mit einem Extinktionsabfall verbunden, der bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen wird.

Zur Messung werden in eine Küvette pipettiert:

Standardlösung	60 µl
Pyruvat-Imidazol-Lösung	3 ml

Zusammensetzung der Pyruvat-Imidazol-Lösung:

Imidazolpuffer (0,1M, pH 7,0)	10 ml
Pyruvatlösung (11 mg/ml)	0,1 ml

Nach Zugabe von 1 µl Lactat-Dehydrogenase wird, sobald die Reaktion in der Küvette zum Stillstand kommt, bei einer Wellenlänge von 340 nm der Extinktionsabfall ΔE gemessen.

Aus der Standardlösung wird bei jeder NADH - Bestimmung eine Verdünnungsreihe hergestellt, auf die man bei der Analyse Bezug nehmen kann.
Als praktisch erwiesen sich für die gegebenen Versuchsbedingungen Konzentrationen im Bereich von
3 - 0,1875 pmol NADH / 20 µl.

Es werden zunächst 20 µl der Standardlösung ad 10,0 ml mit Aqua bidest. verdünnt = Lösung A.

Sodann werden x µl dieser Lösung A ad 1,0 ml mit einer NaOH / Cystein-Lösung (40 mM/0,5 mM) verdünnt = Lösung B (= 3,0 pmol NADH in 20 µl).

Berechnung von x :

$$x = \frac{0{,}615 \cdot 15}{\Delta E} \quad \mu l$$

Verdünnungsreihe:

Lösung:	pmol NADH in 20 µl:	Herstellung:
C	1,5	0,5 ml B + 0,5 ml NaOH/Cyste
D	0,75	0,5 ml C + 0,5 ml "
E	0,375	0,5 ml D + 0,5 ml "
F	0,1875	0,5 ml E + 0,5 ml "

Als Leerwerte werden je 20 µl NaOH / Cystein-Lösung verwendet.

2.5.4. NAD - Standard

Zusammensetzung:

NAD-Lösung (100 mM)		0,1 ml
Aqua bidest.	ad	10,0 ml

Gehaltsbestimmung des Standards:

Das Prinzip der Gehaltsbestimmung (86) beruht auf folgender Reaktion:

$$NAD^+ + \text{Ethanol} \xrightarrow{\text{ADH}} \text{NADH} + \text{Acetaldehyd}$$

Die Bildung von NADH geht mit einem Extinktionsanstieg einher, der bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen wird.

In eine Küvette werden pipettiert:

Puffergemisch	3,0 ml
Standardlösung	0,3 ml

Zusammensetzung des Puffergemisches:

Trispuffer (1M, pH 8,4)		1,0 ml
Ethanol		0,4 ml
EDTA-Lösung (0,1M)		10 µl
Aqua bidest.	ad	10,0 ml

Nach Zugabe von 1 µl Alkohol-Dehydrogenase wird nach dem Abwarten des Reaktionsstillstandes die Extinktionszunahme ΔE bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen.

Die Herstellung einer Verdünnungsreihe bei jeder NAD-Bestimmung in Konzentrationen von 5 - 0,625 pmol NAD / 20 µl erwies sich als geeignet.

Dazu werden 0,1 ml der Standardlösung ad 10,0 ml mit Aqua bidest. verdünnt = Lösung A.

Daraufhin werden x µl dieser Lösung A mit einem Gemisch aus 4 Teilen NaOH/Cystein (40mM/0,5mM) und 40 Teilen H_2SO_4/Na_2SO_4 (20mM/0,1M) ad 1,0 ml verdünnt = Lösung B (=5,0 pmol NAD in 20 µl).

Berechnung von x :

$$x = \frac{0{,}56 \cdot 25}{\Delta E} \quad \mu l$$

Verdünnungsreihe:

Lösung:	pmol NAD in 20 µl:	Herstellung:
C	2,5	0,5 ml B + 0,5 ml Gemisch (
D	1,25	0,5 ml C + 0,5 ml "
E	0,625	0,5 ml D + 0,5 ml "

Als Leerwert dienen je 20 µl des Lösungsgemisches.

2.6.1. Isolierung der Langerhansschen Inseln bei erwachsenen Tieren

nach Lacy und Kostianovsky (87):

Die Ratte wurde mit Äther narkotisiert, das Abdomen durch einen Längsschnitt bis zum Brustbein und beidseitig durch zwei Querschnitte in Becken- und Rippenhöhe geöffnet.
Unter dem Leberlappen konnte nun das Duodenum mit einer Pinzette hervorgezogen werden, um den Ductus pancreaticus sichtbar zu machen und ihn zur Leber hin mit einem Zwirn abzubinden. Zum Magen hin wurde das Duodenum abgeklemmt.
Durch Injektion von 10 ml eisgekühlter Hanks' Lösung in den Ductus pancreaticus blähte sich das Pankreas deutlich auf und ließ sich gut mit einer Schere von Darm, Magen, Milz und Leber abtrennen. Es wurde in eine mit eiskalter Hanks' Lösung gefüllte Petrischale gelegt und von sämtlichen Fettpartikeln befreit.
Anschließend erfolgte eine möglichst gleichmäßige Zerkleinerung des Gewebes mit einer Schere, sodaß sich das Ganze durch den Konus einer 5 ml Rekordspritze aufsaugen ließ.
Nach der Ergänzung des Volumens mit Hanks' Lösung auf 5 ml wurde der gesamte Inhalt der Spritze in ein 20 ml - Schnappdeckelglas überführt, in das 30 mg Collagenase I eingewogen war.

Unter kräftigem Schütteln in einem bei 37 °C thermostatierten Wasserbad ließ man das Enzym so lange auf das Pankreasgewebe einwirken, bis eine homogene, hellbraune, schleimige Flüssigkeit entstanden war. Dies dauerte je nach Aktivität der Collagenase und Größe der Pankreaspartikel 5 bis 15 Minuten.
Die Flüssigkeit füllte man nun in ein kleines Becherglas, homogenisierte sie noch weiter durch dreimaliges Aufziehen durch den Konus der 5 ml- Recordspritze und gab sie durch ein Plastiksieb in einen mit ca. 15 ml eisgekühlter Hanks' Lösung gefüllten 25 ml-Meßzylinder. Auf diese Weise wurde die Collagenasereaktion abgestoppt.
Aufgrund des höheren spezifischen Gewichts der Langerhansschen Inseln im Verhältnis zu den exokrinen Partikeln setzten sich die Inseln am Boden des Zylinders ab, und der Überstand mit dem exokrinen Anteil konnte abgesaugt werden.
Den Unterstand schwemmte man mit eiskalter Hanks' Lösung wieder auf und ließ die Inseln erneut absitzen. Das Ganze wurde ca. acht mal wiederholt.
Durch Aussortieren mit einer Mikropipette unter dem Stereomikroskop konnten die Inseln vollständig vom exokrinen Gewebe getrennt werden.
Alle Arbeitsschritte erfolgten unter Eiskühlung.

2.6.2. Die Isolierung der Langerhansschen Inseln bei neugeborenen und foetalen Ratten

Die 5 Tage alten Neugeborenen bzw. die durch Schnitt entbundenen Foeten wurden, im Unterschied zu den Erwachsenen in der Äthernarkose dekapitiert, siehe auch (9,84,88).
Für einen Versuch wurde jeweils ein ganzer Wurf verwendet, vgl. (9,84), d.h. die Pankreata und damit auch die isolierten Inseln wurden gepoolt.
Zur Isolation des Pankreas legte man das Junge auf die rechte Seite des Körpers. In der Höhe des Magens, der durch die Haut hell durchschimmerte, wurde die Bauchdecke mit einer Schere quer durchtrennt und so das Abdomen geöffnet.
Durch leichtes Pressen an beiden Seiten der Öffnung ließ sich der Magen herausdrücken. Er zeigte bei den Foeten einen durchscheinenden, wässrigen Inhalt, bei den Neugeborenen einen weißen durch die darin enthaltene Milch.
Unterhalb des Magens war nun als helles Häutchen das Pankreas zu erkennen.
Bei den Foeten konnte man es durch eine weiße Färbung deutlich abgrenzen, bei den Neugeborenen unterschied es sich durch eine leicht gelbliche Farbe nur noch wenig von den anderen Geweben.
Auf diese Weise verfuhr man bei allen Jungen eines Wurfs und sammelte deren Pankreata in einer mit eiskalter Hanks' Lösung gefüllten Petrischale.

Des weiteren erfolgte die Gewinnung der Langerhansschen Inseln wie bei den Erwachsenen nach der Collagenase-Methode (87), siehe auch (9,84).
Die vereinigten Pankreata wurden zerkleinert, wobei nur bei den foetalen Geweben ein starkes Aufschäumen zu beobachten war, was vermutlich auf einen Eiweißgehalt zurückzuführen ist.
Das Ganze wurde in eine 5 ml- Recordspritze aufgesaugt, das Volumen auf 2 - 3 ml mit Hanks' Lösung ergänzt und in ein 20 ml- Schnappdeckelglas mit 5 mg Collagenase II überführt. Die Verdauungszeit betrug konstant 10 min. Das Abstoppen der Reaktion und die Verdünnungsschritte wurden wie bei den Erwachsenen durchgeführt.

Identifizierung der Inseln:

Die Inseln der Foeten und Neugeborenen wurden ebenfalls wie die der Erwachsenen unter dem Stereomikroskop unter Eiskühlung aussortiert.
Bedingt durch den geringeren Durchmesser der Inseln benötigte man jedoch eine stärkere Vergrößerung (40 fach), da sie bei der schwächeren nicht zu erkennen waren.
Darüberhinaus wurde am Mikroskop nicht mit Auflicht, sondern mit Durchlicht gearbeitet, d.h. durch den Lichteinfall von unten erschien der Untergrund fast weiß und die darin befindlichen Inseln in einer hellbraunene Farbe, während die exokrinen Anteile eine dunkelbraune bis -graue Farbe besaßen (84).

Bezüglich der Größe wiesen die Inseln der Foeten und Neugeborenen eine breite Streuung auf, wobei im Durchschnitt die foetalen Inseln nur halb so groß waren wie die neugeborenen, 5 Tage alten.
Auch von der Form her zeigten die jungen Inseln eine größere Vielfalt, während bei den Erwachsenen mehr eine runde Form der Inseln vorherrschte.
Bei näherer Betrachtung der Inseln im Vergleich zu den exokrinen Teilen erkennt man bei den letzteren deutlich eine starke Strukturierung in sich, während die Inseln gleichmäßiger und einheitlicher erscheinen.
Nach einer gewissen Gewöhnungszeit des Experimentators sind die Inseln eindeutig zu identifizieren.
Das Auslesen erfolgte mit einer feinen, selbst ausgezogenen Pasteur-Pipette.

2.7. Vorinkubation

Die isolierten Pankreasinseln wurden zur Regeneration des Stoffwechsels nach dem Isolierungsprozess der Vorinkubation unterzogen.
Dazu gab man sie in ein 5 ml - Gläschen und fügte 2 ml KRB-Lösung mit pH 7,35 hinzu, die 2% Rinderalbumin I und eine substimulatorische Menge von 0,54 mg/ml Glucose enthielt.
Das Glas wurde mit einem Gummistopfen verschlossen, über eine Kanüle mit Carbogen begast (95% O_2 und 5% CO_2) und bei 37 °C im Wasserbad während 30 min. langsam geschüttelt. Danach wurden die Inseln drei mal mit eiskalter Hanks' Lösung gewaschen.

2.8. Hauptinkubation

Jeweils 5 bzw. 10 Inseln wurden mit der Pipette in ein 1 ml - Plastik-Eppendorfgefäß mit Deckel bzw. ein 2 ml - Glasgefäß einsortiert und mit 1 ml bzw. 2 ml Hauptinkubationsmedium versetzt.
Dieses bestand aus KRB-Lösung, pH 7,35, mit 2% Rinderalbumin I und der erforderlichen Konzentration an Glucose: 5,6 oder 11,1 oder 16,7 mM Glucose.
Es folgte die Inkubation in der jeweils angegebenen Zeit bei 37 °C unter langsamem Schütteln und Begasung mit Carbogen über Kanülen.
Zur Bestimmung der Pyridinnukleotide wurden die Inseln über einen Zeitraum von 15 Minuten inkubiert.

Diese Zeit wurde gewählt, weil aus Versuchen von E. Hoppe (41) bekannt war, daß bereits nach 15 Minuten die Bildung reduzierter Pyridinnukleotide aufgrund der Glucosestimulation in vollem Umfang erfolgt ist und gemessen werden kann. Im Gegensatz dazu erreicht die sezernierte Insulinmenge der Insel erst nach 90 Minuten Inkubationsdauer eine zur Messung ausreichende Höhe. Um ein während dieser Zeit stattfindendes negatives feed-back des bereits ins Medium sezernierten Insulins auf die weitere Insulinfreisetzung (41) zu verhindern, wurde bei der Insulinbestimmung vor der Hauptinkubation eine 1000 µE IRI bindende Menge Insulinantikörper zugesetzt.

Nach Ablauf der vorgeschriebenen Zeit wurden weitere Stoffwechselvorgänge durch Einstellen der Gläschen ins Eisbad unterbunden.
Zur Insulinbestimmung wurde den im Eisbad stehenden Proben jeweils 500 µl entnommen.
Zur Bestimmung der Pyridinnukleotide ließ man die Gläschen in einer auf 2°C gekühlten Zentrifuge 2 min. bei 2000 U/min. bzw. Proben von Neugeborenen und Foeten bei 1000 U/min. zentrifugieren.
Die überstehende Flüssigkeit wurde in jedem Gefäß abgesaugt, bis die Inseln völlig trocken erschienen. Sie wurden gezählt, um Absaugverluste berücksichtigen zu können. Die Denaturierung der Inseln erfolgte unmittelbar danach durch Auflösen entsprechend der jeweiligen Vorschrift zur Bestimmung der Inhaltsstoffe.

2.9. Meßmethoden

2.9.1. Bestimmung der Pyridinnukleotide

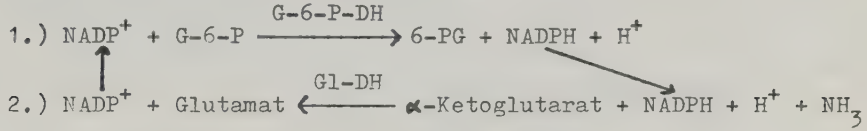
Aufgrund der geringen Mengen der Pyridinnukleotide war es nicht möglich, eine direkte Meßmethode anzuwenden, sondern es war nötig, die zu bestimmenden Substanzen in einem enzymatischen Cyclingprozess anzureichern.
Die Grundlage dieses Verfahrens bildet die Methode nach Passoneau und Lowry (86), durch die eine getrennte Messung von NADPH und NADP sowie von NADH und NAD nebeneinander möglich ist.
Dazu werden zwei verschiedene Cycling-Methoden verwendet:
Zur Bestimmung von NADPH und NADP arbeitet man mit Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Glutamat-Dehydrogenase, zur Bestimmung von NADH und NAD werden Lactat-Dehydrogenase und Glutamat-Dehydrogenase eingesetzt.

Durch Entfernung der reduzierten Coenzyme (die störend wirken) mittels Säurebehandlung können die oxidierten Coenzyme bestimmt werden; durch Entfernung der oxidierten Formen (die stören) durch mildes alkalisches Milieu werden die reduzierten Formen der Coenzyme meßbar.

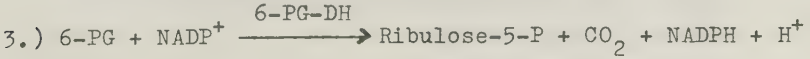
In den Cycling-Reaktionen katalysieren die Nukleotide eine enzymatische Dismutation zwischen zwei Substraten. Da die Nukleotid-Konzentrationen weit unterhalb ihrer K_M- Werte liegen, sind die Reaktionsgeschwindigkeiten proportional der Nukleotid-Konzentrationen.
Nach Ablauf einiger tausend Cyclen wird eines der Produkte gemessen.

2.9.1.1. Bestimmung von NADPH und NADP

Prinzip:
Reaktionszyklus des Cycling-Prozesses:



Das zu bestimmende $NADP^+$ setzt sich mit Glucose-6-phosphat zu NADPH um (Reaktion 1.).
Das so gebildete NADPH bzw. das zu bestimmende NADPH geht in die Reaktion 2.) ein.
Dadurch entsteht ein Reaktionszyklus, in dem pro Zeiteinheit eine definierte Menge 6-Phosphogluconat entsteht, die proportional der eingesetzten NADP- bzw. NADPH-Konzentration ist.
Bei einer Reaktionsdauer von 60 min. werden aus einem Molekül NADP ca. 10 000 - 20 000 Moleküle 6-Phosphogluconat gebildet.
Das erhaltene 6-PG setzt sich in einer weiteren Reaktion 3.) zu Ribulose-5-P und NADPH um. Letzteres wird fluorimetrisch quantitativ gemessen.



Praktische Durchführung:

a) NADPH - Bestimmung:

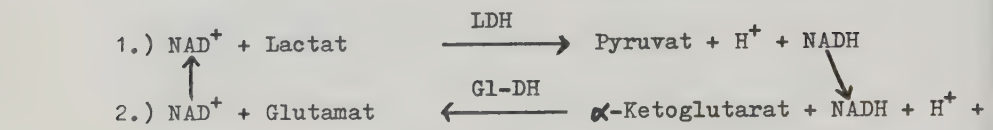
Die inkubierten, trockengesaugten 5 Inseln pro Gefäß werden in je 20 µl NaOH / Cystein - Lösung gelöst. Durch Erhitzen während 15 min. bei 60 °C im Wasserbad wird das vorhandene NADP zerstört.
Die Standard-Verdünnungsreihe für die Eichkurve mit folgenden Konzentrationen:
0,125 pmol, 0,25 pmol, 0,5 pmol, 1,0 pmol und 2,0 pmol NADPH in je 20 µl NaOH / Cystein - Lösung wird ebenfalls der 60°C - Behandlung für 15 min. unterzogen.
Danach werden alle Proben in Eis abgekühlt und mit jeweils 100 µl Cycling - Reagenz versetzt. Für die Cycling - Reaktion werden sie eine Stunde lang bei 38 °C im Wasserbad inkubiert, die durch 2minütiges Erhitzen in kochendem Wasser beendet wird.
Nach dem Abkühlen in Eis gibt man zu den Proben je 1 ml Phosphogluconat - Reagenz, durchmischt sie gut und zentrifugiert 10 min. lang bei 3000 U/min.
Nach 30 min. Stehen bei Raumtemperatur ist die Reaktion beendet. Es folgt die fluorimetrische Messung von NADPH im Überstand, das sich entsprechend der 6-PG-Menge gebildet hat.
Wellenlänge der Anregung: 365 nm
der Messung: 460 nm

b) NADP - Bestimmung:

Die nach der Hauptinkubation trockengesaugten Inseln (pro Gefäß 5) werden in 2 µl NaOH / Cystein-Lösung gelöst und mit 20 µl H_2SO_4 (20 mM) / Na_2SO_4 (0,1 M) - Lösung versetzt und gut durchmischt.
Die Zerstörung des vorhandenen NADPHs erfolgt durch Erhitzen bei 60 °C im Wasserbad für 30 min.
Diese Behandlung erfahren auch die Proben für die Eichkurve mit folgender Verdünnungsreihe:
0,125 pmol, 0,25 pmol, 0,5 pmol 1,0 pmol, 1,5 pmol und 2,0 pmol NADP in je 20 µl des Cystein / NaOH - H_2SO_4 / Na_2SO_4 - Gemisches. Danach werden den abgekühlten Proben je 100 µl Cycling - Reagenz zugesetzt.
Die weitere Durchführung erfolgt in identischen Schritten wie bei der zuvor beschriebenen NADPH-Bestimmung.

2.9.1.2. Bestimmung von NADH und NAD:

Prinzip:
Reaktionszyklus des Cycling - Prozesses:



Das zu bestimmende NAD^+ setzt sich mit Lactat zu Pyruvat und NADH um (Reaktion 1.).
Das auf diese Weise gebildete bzw. das zu bestimmende NADH geht in die Reaktion 2.) ein.
Dadurch entsteht wiederum ein Reaktionszyklus, in dem pro Zeiteinheit eine bestimmte Menge Pyruvat gebildet wird, die der eingesetzten NAD^+- bzw. NADH- Konzentration proportional ist.
Wenn man, wie in diesem Fall, den Reaktionszyklus 60 min. lang ablaufen läßt, erhält man aus einem Molekül NAD^+ ca. 6000 Moleküle Pyruvat.
Mit erneut zugesetztem NADH reagiert das gebildete Pyruvat weiter zu Lactat und NAD^+, letzteres wird fluorimetrisch quantitativ bestimmt.

Praktische Durchführung:

a) NADH - Bestimmung:

Um eine noch meßbare Ausbeute an NADH zu erhalten, werden für diese Bestimmung 10 Inseln (statt wie bisher 5) inkubiert und anschließend trockengesaugt.

In 20 µl eines NaOH/Cystein (40mM/0,5mM) - Gemisches werden die Inseln aufgelöst. Im Anschluß daran erfolgt die Zerstörung des gleichzeitig vorhandenen NAD durch 15minütiges Erhitzen im Wasserbad bei 60°C sowohl der Proben als auch der Standard-Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen:
3,0 pmol, 1,5 pmol, 0,75 pmol, 0,375 pmol und 0,1875 pmol NADH in je 20 µl NaOH/Cystein-Gemisch.
Nach dem Abkühlen in Eis wird jede Probe mit 100 µl Cycling-Reagenz versetzt und 60 min. lang bei 25°C im Wasserbad inkubiert.
Um den Cycling-Prozess abzustoppen, werden alle Proben 2 min. in kochendem Wasser erhitzt.
Zu den abgekühlten Proben werden je 100 µl Pyruvat-Reagenz hinzugefügt, welches 15 min. bei Raumtemperatur einwirken muß.
Um überschüssiges NADH zu zerstören, wird je 25 µl 5N HCl zugegeben. Nach dem Alkalisieren mit je 1 ml 6N NaOH wird noch 10 min. bei 60°C im Wasserbad erhitzt.
Anschließend wird 10 min. bei 3000 U/min. zentrifugiert.
Nun kann man das entsprechend der Pyruvatmenge gebildete NAD im Überstand fluorimetrisch messen.
Wellenlänge der Anregung: 365 nm
der Messung: 460 nm

b) NAD - Bestimmung:

Die inkubierten und trockengesaugten 5 Inseln je Gefäß werden in 2 µl NaOH/Cystein-Lösung aufgelöst und mit 20 µl eines H_2SO_4/Na_2SO_4 (20mM/0,1M) - Gemisches versetzt und gut durchmischt.
Durch Erhitzen im Wasserbad bei 60°C für 30 min. wird das im Inselhomogenat anwesende NADH im sauren Milieu zerstört.
Ebenso wird mit den Proben der Standard-Verdünnungsreihe verfahren, die in folgenden Konzentrationen hergestellt wird:
5,0 pmol, 2,5 pmol, 1,25 pmol, 0,625 pmol NAD pro 20 µl des Cystein/NaOH-H_2SO_4/Na_2SO_4-Gemisches.
Die weiteren Schritte der Erfassung des NAD erfolgen analog der NADH - Bestimmung.

2.9.2. Insulinbestimmung in Gegenwart von Insulin - Antikörpern

a) Prinzip:

Um die ins Inkubationsmedium sezernierte Insulinmenge quantitativ erfassen zu können, muß zuvor der dem Medium zugesetzte Insulin-Antikörper abgetrennt werden.
Da seine Bindungsstellen nie alle besetzt sind bzw. die Bindung Insulin - Antikörper jederzeit wieder gelöst werden kann, besteht das Problem, daß dieser mit dem Antikörper, der bei der Insulinmeßmethode eingesetzt wird (s.u.), konkurriert und somit die Meßwerte verfälschen kann.
Die Abtrennung erfolgt - mit einigen Variationen - nach der Methode von Heding (89), nach der in der vorliegenden Arbeit die Gesamtinsulinwerte ermittelt werden.
Durch Säurezusatz und anschließende Ausfällung des Antikörpers mit Äthanol 96% kann dieser abgetrennt werden.
Zur Kontrolle wird bei jedem Versuch eine Verdünnungsreihe mit bekannten Insulinkonzentrationen in gleicher Weise wie die Proben behandelt, um die durch die Aufarbeitung eventuell entstandenen Fehler ausschalten zu können.

b) Durchführung der Gesamtinsulinbestimmung:

Je 5 Langerhanssche Inseln werden nach Zusatz von 1 ml Inkubationsmedium und 1000 µE/ml Insulin - Antikörper 90 min. lang inkubiert,und anschließend wird je 500 µl vom Überstand abgenommen, die in 5 ml-Polyäthylengläschen gegeben werden.
Die Insulinstandard-Verdünnungsreihe von 1000 µE, 500 µE, 250 µE, 125 µE, 62,5 µE und 31,25 µE Insulin/ml enthält dieselbe Menge Antikörper und wird im folgenden genauso wie die Proben behandelt.

Die Aufspaltung der Insulin - Antikörperbindung erfolgt durch Zugabe von 100 µl 1N HCl und 60minütige Inkubation bei 37°C im Wasserbad.
Durch Zupipettieren von 3 ml 96%igem Äthanol pro Probe und Einstellen des pH-Wertes auf 7,2-7,5 durch Zusatz von 90-95 µl 1N NaOH wird der Antikörper als weißer, flockiger Niederschlag ausgefällt.Ein genaues Einstellen des pH-Wertes in diesem Bereich ist wichtig, da sonst der Antikörper nur unvollständig ausgefällt wird.
Nach 10minütigem Absitzen wird 10 min. bei 3000 U/min. zentrifugiert und 1 ml des Überstandes vorsichtig in kleine Plastikgläschen abpipettiert.
Die Proben werden zum Vorkühlen in den Gefrierschrank gestellt und anschließend gefriergetrocknet.

Die auf diese Art und Weise aufgearbeiteten Proben können im Gefrierschrank aufbewahrt und dann zur üblichen Insulinbestimmung verwendet werden.

Bestimmungsmethode für Insulin:

Die Messung der Insulinkonzentration erfolgt nach der Doppelantikörpermethode von Söldner und Slone (90) in Doppelbestimmungen durch Radioimmunoassay mit dem INSIK^{R}-Kit. Zur Erstellung der Eichkurve verwendet man Ratteninsulin.

Die gefriergetrockneten Proben werden in 80-120 µl, je nach zu erwartender Insulinmenge, Puffergemisch folgender Zusammensetzung vollständig aufgelöst:

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$		550 mg
Rinderalbumin		1 g
Aqua bidest.	ad	100 ml

Von dieser Lösung werden 10 µl in zuvor durchnummerierte Plastikgläschen gegeben und 1:10 mit demselben Puffer verdünnt. Ebenso verfährt man mit der Verdünnungsreihe für die Eichkurve.
Als Leewert werden 100 µl Puffer vorgelegt.

Der lyophilisierte Antikörperkomplex wird laut Vorschrift gelöst und je 100 µl davon den Proben zugesetzt und diese gut geschüttelt.
Diese verbleiben für ca. 6 Std. bei 4°C im Kühlschrank.
Dann erfolgt ein erneuter Pufferzusatz, diesmal von 1 ml eisgekühlter Pufferlösung.
Nach der Zentrifugation von 20 min. bei 3500 U/min. bei 4°C kann der Überstand vom Doppelantikörperkomplex dekantiert werden. Mittels einer Wasserstrahlpumpe können die restlichen Tröpfchen, die noch anhaften, abgesaugt werden.

Sodann werden die Proben im automatischen γ-Counter 1 Minute lang gezählt.

Berechnung der Insulinwerte:

Aus den Doppelbestimmungen läßt sich der Mittelwert der Zählerrate errechnen.

Man bildet den Quotienten aus der jeweiligen Zählerrate der Proben und der ermittelten Zählerrate des Leerwertes.

Anhand einer ebenfalls auf diese Weise erstellten Eichkurve, im Bereich von 0 - 2000 µE, können die Insulinwerte der Proben mit einem entsprechenden Computerprogramm errechnet werden.

2.10. Versuchsauswertung

Die Berechnung der Eichgeraden und das Abgreifen der Meßwerte wurde mit einem entsprechenden Computerprogramm durchgeführt.

Alle angegebenen Meßwerte, außer den NADPH / NADP - Quotienten und den NADH / NAD - Quotienten, stellen Mittelwerte $\pm$ SEM dar, die aus der in den Abbildungen angegebenen Anzahl (n) der Versuche errechnet wurden.

Für die Berechnung signifikanter Unterschiede von Mittelwerten wurde der Student - t - Test angewandt. Ein t - Test für $P < 0{,}05$ wurde als signifikant angesehen.

2.11. Darstellung der Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden zum einen in Form von Tabellen dargestellt, um die exakten Zahlenwerte aufzuzeigen, zum anderen in Form von Abbildungen, um sie optisch besser überschaubar zu gestalten und um gegebenenfalls in einer graphischen Darstellung direkte Vergleiche der Werte zu ermöglichen.

3. Versuchsergebnisse

3.1. Einfluß von Glucose auf den Gehalt an NADPH und NADP sowie den NADPH/NADP - Quotienten Langerhansscher Inseln bei Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten

Um eine direkte Gegenüberstellung der verschiedenen Entwicklungsstufen zu erhalten, wurden die isolierten Pankreasinseln unter jeweils identischen Bedingungen untersucht.
Die Inkubation von je 5 Inseln erfolgte in 1 ml Medium über einen Zeitraum von 15 Minuten.
Um die Beziehung zwischen dem Gehalt an NADPH und NADP unter unterschiedlichen Glucosekonzentrationen festzustellen, wurde zum einen ohne Glucosezusatz, zum anderen mit steigender Glucosekonzentration (5,6 mM bzw. 11,1 mM bzw. 16,7 mM) inkubiert.

3.1.1. Erwachsene Ratten

Um unmittelbare Vergleichswerte mit den Inseln von Neugeborenen und Foeten zu erhalten, wurde nochmals der Effekt von Glucose auf die Konzentration an NADPH und NADP in Inseln erwachsener Tiere gemessen.
Wie Tabelle 1 und Abb. 1 zeigen, stieg der Gehalt an NADPH dosisabhängig vom Kontrollwert in Abwesenheit von Glucose von 0,73 pmol/10 Inseln signifikant nahezu auf das Doppelte von 1,36 pmol/10 Inseln bei 16,7 mM Glucose.

Analog zu der Zunahme des NADPH fand sich ein Abfall des NADP (siehe Tabelle 2 und Abb. 2).
In Abhängigkeit von der Konzentration der Glucose sank der Gehalt an NADP in 10 Inseln statistisch signifikant von 1,67 pmol ohne Glucose auf 1,04 pmol bei 16,7 mM Glucose.
Bei der Berechnung des NADPH/NADP-Quotienten zeigte sich ein Anstieg von 0,44 ohne Glucose auf 1,31 bei 16,7 mM Glucose (Tabelle 3 und Abb. 3).

3.1.2. Neugeborene, 5 Tage alte Ratten

Wie Tabelle 1 und Abb. 1 zeigen, verläuft der Anstieg des insulären NADPH bei Neugeborenen nahezu parallel zu den Erwachsenen.
In Abhängigkeit von der Glucosekonzentration im Medium stieg der NADPH - Gehalt von 0,58 pmol pro 10 Inseln in Abwesenheit von Glucose nahezu auf die doppelte Höhe von 1,09 pmol pro 10 Inseln in Gegenwart von 16,7 mM Glucose (siehe Tabelle 1 und Abb. 1).
Dieser Wert, wie auch bereits der bei 11,1 mM Glucose, unterscheiden sich signifikant vom Kontrollwert.

Auch ein Vergleich des NADP - Gehaltes der Pankreasinseln von neugeborenen Ratten zeigt deutlich einen analogen Verlauf zu den Erwachsenen (siehe Tabelle 2 und Abb. 2).
Mit einer Steigerung der Glucosekonzentration von 0 auf 16,7 mM ist ein statistisch signifiksnter Abfall des NADP von 1,45 pmol auf 1,00 pmol in jeweils 10 Inseln verbunden (vgl. Tabelle 2 und Abb. 2).

Wie der Tabelle 3 und Abb. 3 zu entnehmen ist, verläuft auch der Anstieg des insulären NADPH/NADP - Quotienten bei Neugeborenen in derselben Weise wie bei den Erwachsenen. Dosisabhängig von der Glucosemenge liegt der NADPH/NADP - Quotient bei 0,4 ohne Glucose im Medium und steigt an auf 1,09 bei 16,7 mM Glucose (siehe Tabelle 3 und Abb.3).

3.1.3. Foeten

Aus Abb. 1 und Tabelle 1 wird die Entwicklung des NADPH - Gehaltes der foetalen Inseln bei Steigerung der Glucosemenge ersichtlich.
Im Gegensatz zu der Situation bei Erwachsenen und Neugeborenen führte keine der verwendeten Glucosekonzentrationen zu einer signifikanten Änderung des Gehalts an NADPH.

Aus Abb. 2 und Tabelle 2 geht hervor, daß bei Pankreasinseln foetaler Ratten der NADP - Gehalt ebenfalls nicht durch die Anwesenheit von Glucose im Inkubationsmedium beeinflußt wird.
In Anwesenheit verschiedener Glucosemengen ist kein signifikanter Unterschied der NADP - Konzentration festzustellen. Sie liegt mit 0,6 pmol in 10 Inseln etwas unter dem Niveau der Neugeborenen und Erwachsenen.

Dementsprechend bleibt auch der Quotient aus NADPH und NADP für die Inseln der Foeten konstant bei etwa 1,3 bei allen eingesetzten Glucosemengen.

3.1.4. Erwachsene - Neugeborene - Foeten

Stellt man den Verlauf des NADPH - Gehaltes der Langerhansschen Inseln der einzelnen Altersstufen in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration gegenüber, so ist bei Erwachsenen und Neugeborenen praktisch eine identische Reaktion auf das Stimulans, nämlich ein Anstieg des NADPH - Gehaltes, festzustellen, während sich der insuläre NADPH - Gehalt der Foeten etwa auf der Höhe der Basalwerte der beiden anderen Gruppen bewegt (Tabelle 1 und Abb. 1).
Analog hierzu verhalten sich die NADP-Gehalte bei Erwachsenen und Neugeborenen dosisabhängig von der Glucosemenge nahezu identisch (siehe Tabelle 2 und Abb. 2), wohingegen die foetale Insel einen sehr viel geringeren Gehalt an NADP aufweist, der auch durch Glucose nicht beeinflußbar ist.
Dementsprechend verläuft auch die Entwicklung der NADPH/NADP-Quotienten bei erwachsenen und neugeborenen Tieren unter dem Einfluß der Glucose im Medium analog. Dagegen ist festzustellen, daß sich das Verhältnis von NADPH zu NADP bei den Foeten gleichbleibend auf der Höhe der Spitzenwerte der anderen beiden Altersstufen bewegt. Das bedeutet, daß ein relativ hoher Anteil der Pyridinnukleotide bei den Foeten in reduzierter Form vorliegt ohne Rücksicht auf die Glucosemenge im Medium.

Bildet man die Summe der reduzierten und oxidierten Formen (siehe Tabelle 4 und Abb. 4), so erreichen die 10 Inseln von neugeborenen Ratten fast die Werte der erwachsenen, die der Foeten liegen jedoch um ein gutes Drittel darunter, was wohl auf die geringere Größe der Inseln zurückzuführen ist.

	NADPH pmol / 10 Inseln			statistische Auswertung:
Glucose mM	Erwachsene	Neugeborene	Foeten	
0	a) 0,73 ± 0,08 (n=14)	e) 0,58 ± 0,04 (n=24)	i) 0,78 ± 0,10 (n=25)	ab: n.s. ac: P<0,1 ad: P<0,01 bd: P<0,05 cd: n.s. ef: P<0,05 eg: P<0,001 eh: P<0,001 fg: P<0,01 fh: P<0,001 gh: n.s. ik: n.s. il: n.s. im: n.s. kl: n.s. km: n.s. lm: n.s. dm: P<0,01 hm: P<0,01
5,6	b) 0,86 ± 0,14 (n=16)	f) 0,68 ± 0,04 (n=25)	k) 0,75 ± 0,10 (n=26)	
11,1	c) 1,00 ± 0,10 (n= 17)	g) 0,90 ± 0,07 (n=21)	l) 0,71 ± 0,06 (n=26)	
16,7	d) 1,36 ± 0,16 (n=17)	h) 1,09 ± 0,08 (n=23)	m) 0,78 ± 0,06 (n=24)	

Tabelle 1 : Einfluß von Glucose auf den Gehalt an NADPH isolierter Pankreasinseln von erwachsenen Ratten, von neugeborenen (5 Tage alten) Ratten und von foetalen Ratten (am 22. Tag der Schwangerschaft).
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Min. inkubiert.
Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

	NADP PMOL / 10 INSELN			statistische Auswertung:
Glucose mM	Erwachsene	Neugeborene	Foeten	
0	a) 1,65 ± 0,12 (n=24)	e) 1,45 ± 0,09 (n=21)	i) 0,58 ± 0,04 (n= 23)	ab: n.s. ac: P<0,01 ad: P<0,001 bc: n.s. bd: P<0,02 cd: n.s.
5,6	b) 1,42 ± 0,12 (n=26)	f) 1,38 ± 0,11 (n= 19)	k) 0,57 ± 0,05 (n=20)	ef: n.s. eg: P<0,001 eh: P<0,001 fg: P<0,02 fh: P<0,01 gh: n.s.
11,1	c) 1,20 ± 0,10 (n=24)	g) 1,03 ± 0,07 (n=21)	l) 0,57 ± 0,04 (n=23)	ik: n.s. il: n.s. im: n.s. kl: n.s. km: n.s. lm: n.s.
16,7	d) 1,04 ± 0,10 (n=23)	h) 1,00 ± 0,07 (n=19)	m) 0,64 ± 0,05 (n=19)	

elle 2 : Einfluß von Glucose auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln an NADP von erwachsenen Ratten, von neugeborenen (5 Tage alten) Ratten und von foetalen Ratten (am 22. Tag der Schwangerschaft).
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Min. inkubiert.
Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

	NADPH / NADP		
Glucose mM	Erwachsene	Neugeborene	Foeten
0	a) 0,44	e) 0,40	i) 1,34
5,6	b) 0,61	f) 0,49	k) 1,32
11,1	c) 0,83	g) 0,87	l) 1,25
16,7	d) 1,31	h) 1,09	m) 1,22

abelle 3 : Einfluß von Glucose auf den NADPH / NADP - Quotienten isolierter Pankreasinseln von erwachsenen Ratten, von neugeborenen (5 Tage alten) Ratten und von foetalen Ratten (am 22. Tag der Schwangerschaft).
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Min. inkubiert.

	NADPH + NADP pmol / 10 Inseln		
Glucose mM	Erwachsene	Neugeboren	Foeten
0	a) 2,38	e) 2,03	i) 1,36
5,6	b) 2,28	f) 2,06	k) 1,32
11,1	c) 2,20	g) 1,93	l) 1,28
16,7	d) 2,40	h) 2,09	m) 1,42

Tabelle 4 : Einfluß von Glucose auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln an NADPH + NADP von erwachsenen Ratten, von neugeborenen (5 Tage alten) Ratten und von foetalen Ratten (am 22. Tag der Schwangerschaft).
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Min. inkubiert.

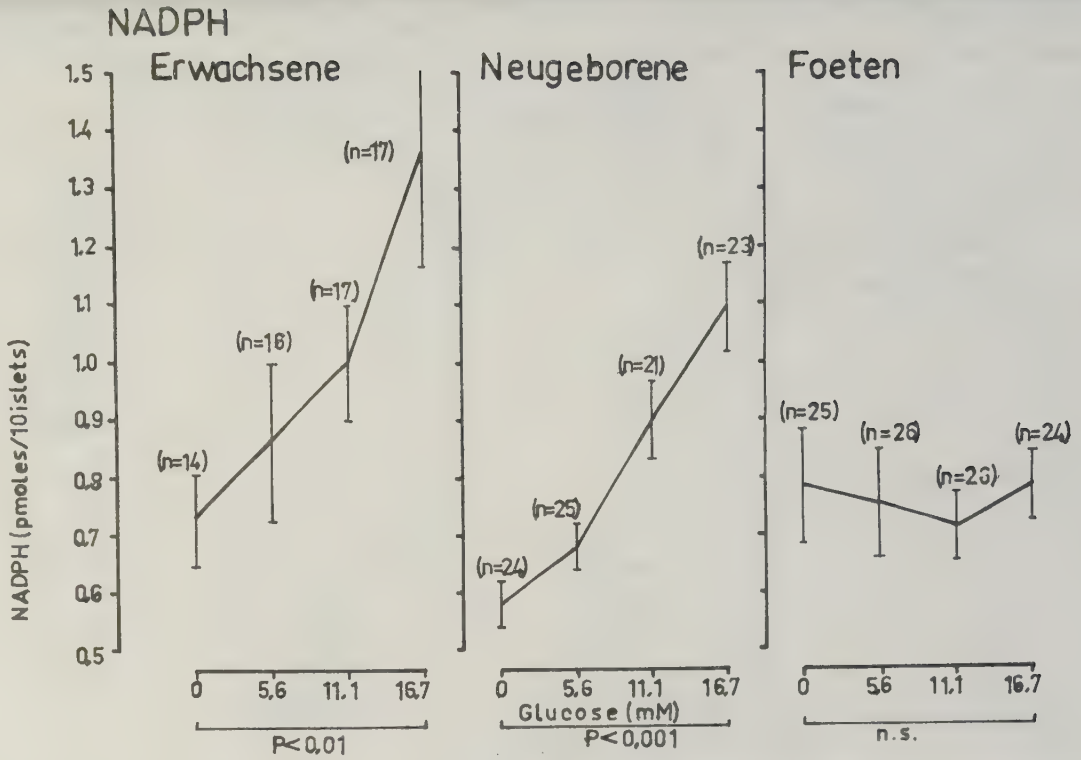


Abb.1: Einfluß von Glucose auf den Gehalt an NADPH isolierter Pankreasinseln von erwachsenen Ratten, von neugeborenen (5Tage alten) Ratten und von foetalen Ratten (am 22. Tag p.c.) Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Min. inkubiert.
Mittelwerte $\pm$ SEM; n = Anzahl der Versuche

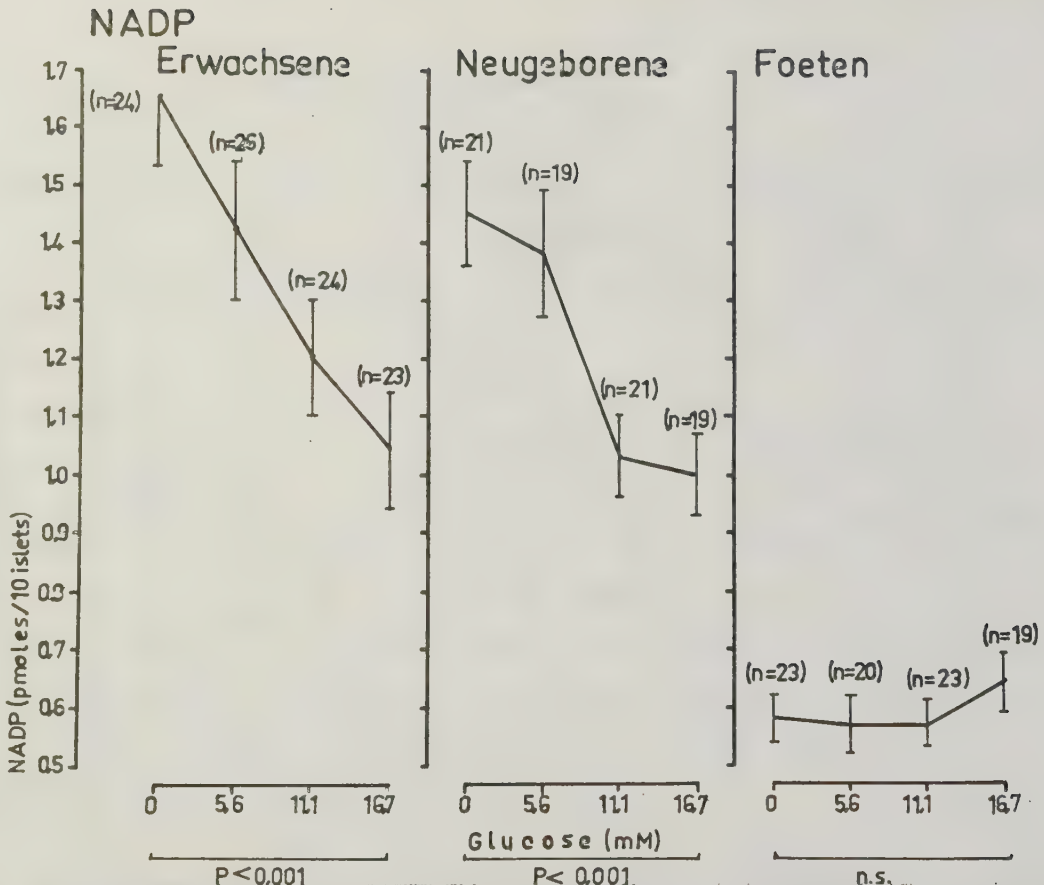


Abb.2: Einfluß von Glucose auf den Gehalt an NADP isolierter Pankreasinseln von erwachsenen Ratten, von neugeborenen (5 Tage alten) Ratten und von foetalen Ratten (am 22. Tag p.c.). Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Min. inkubiert. Mittelwerte $\pm$ SEM; n=Anzahl der Versuche.

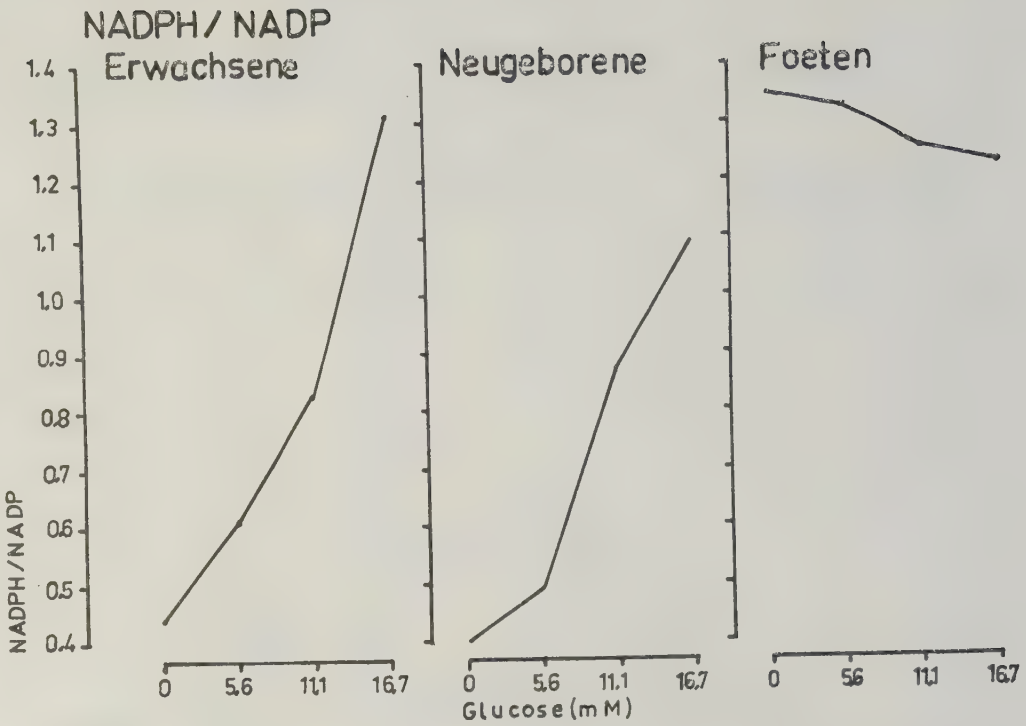


Abb.3: Einfluß von Glucose auf den NADPH/NADP-Quotienten isolierter Pankreasinseln von erwachsenen Ratten, von neugeborenen (5 Tage alten) Ratten und von foetalen Ratten (am 22. Tag p.c.) Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Min. inkubiert.

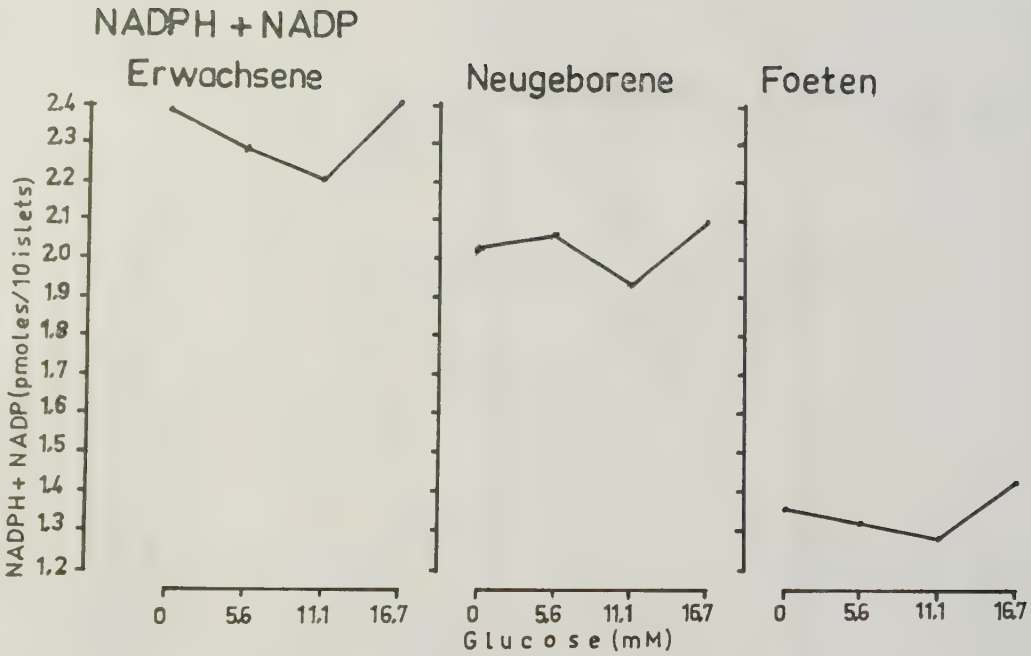


Abb.4: Einfluß von Glucose auf den Gehalt an NADPH + NADP isolierter Pankreasinseln von erwachsenen Ratten, von neugeborenen (5 Tage alten) Ratten und von foetalen Ratten (am 22. Tag p.c.)
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Min. inkubiert.

3.2. Einfluß von Glucose auf den Gehalt an NADH und NAD sowie den NADH/NAD - Quotienten Langerhansscher Inseln bei Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten

In dieser Versuchsserie sollte festgestellt werden, ob in allen drei Entwicklungsstufen bei der Ratte die Zugabe von Glucose eine Änderung des Gehalts an NADH und NAD der Langerhansschen Insel bewirkt.

Entsprechend den Untersuchungen hinsichtlich des Gehalts an NADPH und NADP wurden dieselben Versuchsbedingungen gewählt.
Für die Messung des NADH - Gehalts wurden 10 Inseln in 2 ml, für die Bestimmung des NAD - Gehalts wurden 5 Inseln in 1 ml Medium 15 Minuten lang inkubiert.

Um das insuläre NADH bestimmen zu können, mußten 10 Inseln eingesetzt werden, da der Gehalt an NADH von nur 5 Inseln unterhalb der erfaßbaren Grenze unserer Meßmethoden lagen.

Aus den Untersuchungen von E. Hoppe (41) war ersichtlich, daß eine Verlängerung der Inkubationszeit von 15 Minuten auf 90 Minuten keine signifikante Änderung des NADH - Gehaltes hervorrief.

Analog zu den vorhergehenden Versuchen wurde ebenfalls ohne Glucose und mit Glucosekonzentrationen von 5,6 mM bzw. 11,1 mM bzw. 16,7 mM inkubiert.

3.2.1. Erwachsene Ratten

Um die folgenden Meßwerte der Neugeborenen und Foeten direkt gegenüberstellen zu können, wurden zuerst die Versuche mit Inseln erwachsener Ratten durchgeführt.

Betrachtet man die Änderung des NADH - Gehalts in Abhängigkeit von der eingesetzten Glucosemenge im Inkubationsmedium (siehe Tabelle 5 und Abb. 5), so zeichnet sich ein deutlicher Anstieg ab.
Während in Abwesenheit von Glucose und bei 5,6 mM Glucose der NADH - Gehalt der 10 Inseln bei 0,63 bzw. 0,76 pmol liegt, steigt er bei weiterer Erhöhung der Glucosezugabe auf 11,1 mM bzw. 16,7 mM auf 0,93 bzw. 1,07 pmol / 10 Inseln an (vgl. Tabelle 5 und Abb.5). Diese Stimulation der NADH - Bildung in der Insel erweist sich, bezogen auf den Kontrollwert, als statistisch signifikant.

Im Vergleich dazu stellt sich der Verlauf des NAD - Gehaltes bei Variation der zugegebenen Glucosemenge anders dar, wie Tabelle 6 und Abb. 6 zeigen.
Die NAD - Meßwerte, bezogen auf 10 Inseln, unterliegen zwar geringen Schwankungen, unterscheiden sich aber nicht statistisch signifikant voneinander.
Nach einem leichten Anstieg von 4,91 auf 5,06 pmol NAD / 10 Inseln in Abwesenheit von Glucose bzw. in Gegenwart von 5,6 mM Glucose im Medium fallen die Werte des gemessenen NAD - Gehalts wieder leicht ab auf 4,52 und 4,62 pmol / 10 Inseln bei 11,1 bzw. 16,7 mM Glucosekonzentration (siehe Tabelle 6 und Abb.6).

Bildet man nun rechnerisch den Quotienten des NADH - und NAD - Gehaltes aus den beiden Versuchsreihen, so zeigen Tabelle 7 und Abbildung 7 eine eindeutige Verlagerung des Verhältnisses NADH / NAD zugunsten des reduzierten Anteils mit steigender Glucosekonzentration. Zwischen den beiden Werten ohne Glucose und bei 5,6 mM Glucosezusatz, die bei 0,13 und 0,15 liegen, und den Quotienten bei 11,1 und 16,7 mM Glucose, die bei 0,21 und 0,23 liegen, erkennt man eine deutliche Steigerung (vgl. Tabelle 7 und Abb. 7).

3.2.2. Neugeborene, 5 Tage alte Ratten

Wie aus Tabelle 5 und Abb. 5 zu erkennen ist, stimuliert die vermehrte Zugabe von Glucose in die Inkubationslösung bei den neugeborenen Ratten ebenfalls die Bildung von NADH in der Langerhansschen Insel.

Während der Kontrollwert ohne Glucose durchschnittlich 0,33 pmol NADH in 10 Inseln beträgt, steigt der insuläre NADH - Gehalt dosisabhängig von der Glucosekonzentration an über 0,41 pmol/10 Inseln bei 5,6 mM und 0,55 pmol/10 Inseln bei 11,1 mM Glucose und erreicht bei 16,7 mM Glucose mit 0,6 pmol/10 Inseln beinahe das Doppelte des Kontrollmeßergebnisses (vgl. Tabelle 5 und Abbildung 5).
Die beiden letzteren Werte weisen einen statistisch signifikanten Unterschied zum Kontrollwert auf.

Im Gegensatz dazu übt eine Änderung der Glucosekonzentration bei den neugeborenen Ratten keinen Einfluß auf den Gehalt der Inseln an NAD aus, wie Tabelle 6 und Abbildung 6 erkennen lassen.
Der NAD-Gehalt von je 10 Inseln liegt in Abwesenheit von Glucose und in Gegenwart von 16,7 mM Glucose im Inkubationsmedium in genau derselben Höhe von 3,01 pmol. Der geringe Anstieg auf 3,48 pmol bzw. 3,29 pmol NAD in 10 Inseln bei 5,6 bzw. 11,1 mM Glucose zeigt keine statistische Signifikanz (siehe Tabelle 6 und Abb. 6).

Trägt man nach Berechnung der Quotienten aus NADH und NAD für die Neugeborenen diese graphisch auf (vgl. Tabelle 7 und Abb. 7), so verläuft der Anstieg dosisabhängig von der Glucosemenge steil nach oben.
Bei fehlender Glucose und bei 5,6 mM Glucose liegen die Werte dicht beieinander bei 0,11 und 0,12 und steigen dann deutlich an bis 0,17 und 0,2, wenn man die Glucosekonzentration auf 11,1 und 16,7 mM erhöht (vgl. Tabelle 7 und Abb. 7).

3.2.3. Foeten

Wie man aus Tabelle 5 und Abbildung 5 ersehen kann, übt die Anwesenheit verschiedener Mengen Glucose im Inkubationsmedium auch bei den foetalen Inseln der Ratte einen Einfluß auf den Gehalt an NADH aus.

Den Einzelwerten in Tabelle 5 und Abb. 5 ist zu entnehmen, daß sich der NADH - Gehalt der 10 foetalen Inseln von 0,51 pmol bei 11,1 mM Glucose und von 0,55 pmol bei 16,7 mM Glucose sowohl vom Kontrollwert von 0,26 pmol NADH ohne Glucosezugabe, als auch von dem Wert von 0,33 pmol NADH bei 5,6 mM Glucose signifikant unterscheidet.

Anders stellt sich die Situation im Hinblick auf den NAD - Gehalt der foetalen Inseln dar (siehe Tabelle 6 und Abbildung 6).
Dieser ist durch verschiedene Glucosekonzentrationen nicht signifikant beeinflußbar.
Tabelle 6 und Abb. 6 zeigen, daß die NAD - Menge in je 10 Inseln in Gegenwart von 5,6 mM Glucose und 11,1 mM Glucose in derselben Höhe von 2,51 bzw. 2,52 pmol liegt, der Kontrollwert ohne Glucosezusatz bei 2,3 pmol dagegen etwas tiefer liegt und bei der höchsten Glucosekonzentration von 16,7 mM das insuläre NAD sogar auf 2,15 pmol absinkt, jedoch ohne sich statistisch signifikant voneinander zu unterscheiden.

Bei der Berechnung des NADH/NAD - Quotienten kommt man zu der Aussage, daß auch beim Foeten unter dem Einfluß steigender Glucosemengen sich das Verhältnis von NADH zu NAD stark zur reduzierten Form verlagert. Ohne Glucose und bei 5,6 mM liegen die NADH/NAD - Quotienten bei 0,11 und 0,13 auf demselben Niveau und erhöhen sich dann bei 11,1 mM und 16,7 mM sehr stark auf 0,2 und 0,26 , wie Abbildung 7 und Tabelle 7 deutlich machen.

3.2.4. Erwachsene - Neugeborene - Foeten

Bei der vergleichenden Betrachtung der drei Altersgruppen kommt man zu dem Schluß, daß sich bei allen der NADH- und NAD- Gehalt der Inseln unter dem Einfluß von Glucose verändert.
Im absoluten Gehalt, bezogen auf 10 Inseln, liegen die NADH- und NAD- Meßwerte bei den Erwachsenen jeweils höher als bei den Neugeborenen und Foeten, der Verlauf der Änderung in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration ist jedoch parallel in allen drei Entwicklungsstufen.

Der NADH- Gehalt nimmt, je mehr Glucose man dem Inkubationsmedium zusetzt, bei jeder Altersstufe kontinuierlich zu, wie Tabelle 5 und Abbildung 5 erkennen lassen.

Der NAD- Gehalt dagegen wird in keiner der untersuchten Gruppen durch Glucose verändert, er liegt nur, wahrscheinlich entsprechend der jeweiligen Größe der

Langerhansschen Inseln, bei den Neugeborenen bei etwa zwei Drittel, bei den Foeten bei der Hälfte der Werte der Erwachsenen (vgl. Tabelle 6 und Abbildung 6).

Stellt man die NADH/NAD- Quotienten der jungen und der erwachsenen Ratten gegenüber, so fällt auf, daß durch die Stimulation der Glucose bei den Foeten der stärkste Anstieg zu verzeichnen ist, die Zunahme verläuft bei den neugeborenen und erwachsenen Tieren etwa gleich (siehe Tabelle 7 und Abbildung 7).

Betrachtet man nun den insulären Gesamtgehalt an NADH und NAD, so liegt dieser, unabhängig von der Anwesenheit von Glucose im Medium, gleichbleibend auf demselben Niveau, wie man Abbildung 8 und Tabelle 8 entnehmen kann.
Die Inseln der erwachsenen Ratten enthalten nur wieder in etwa die doppelte Menge an Pyridinnukleotiden wie die der Foeten und um ein Drittel mehr als die der Neugeborenen, was sicherlich durch die Größenunterschiede der Inseln bedingt ist.

Glucose mM	NADH pmol / 10 Inseln			statistische Auswertung:
	Erwachsene	Neugeborene	Foeten	
0	a) 0,63 ± 0,06 (n=12)	e) 0,33 ± 0,04 (n=11)	i) 0,26 ± 0,03 (n=12)	ab: n.s. ac: P < 0,01 ad: P < 0,001 bc: n.s. bd: P < 0,02 cd: n.s. ef: n.s. eg: P < 0,01 eh: P < 0,001 fg: n.s. fh: P < 0,02 ik: n.s. il: P < 0,001 im: P < 0,001 kl: P < 0,01 km: P < 0,001 lm: n.s.
5,6	b) 0,76 ± 0,07 (n=11)	f) 0,41 ± 0,05 (n=13)	k) 0,33 ± 0,03 (n=13)	
11,1	c) 0,93 ± 0,05 (n=12)	g) 0,55 ± 0,05 (n=13)	l) 0,51 ± 0,05 (n=13)	
16,7	d) 1,07 ± 0,09 (n=12)	h) 0,60 ± 0,05 (n=13)	m) 0,55 ± 0,05 (n=13)	

Tabelle 5: Einfluß von Glucose auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln an NADH von erwachsenen Ratten, von neugeborenen (5Tage alten) Ratten und von foetalen Ratten (am 22. Tag der Schwangerschaft). Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 15 Min. inkubiert.
Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

Glucose mM	NAD pmol / 10 Inseln			statistische Auswertung:
	Erwachsene	Neugeborene	Foeten	
0	a) 4,91 ± 0,39 (n=20)	e) 3,01 ± 0,29 (n=19)	i) 2,30 ± 0,19 (n=18)	ab: n.s. ac: n.s. ad: n.s.
5,6	b) 5,06 ± 0,36 (n=19)	f) 3,48 ± 0,29 (n=19)	k) 2,51 ± 0,24 (n=19)	ef: n.s. eg: n.s. eh: n.s.
11,1	c) 4,52 ± 0,32 (n=19)	g) 3,29 ± 0,39 (n=19)	l) 2,52 ± 0,23 (n=18)	ik: n.s. il: n.s. im: n.s.
16,7	d) 4,62 ± 0,36 (n=19)	h) 3,01 ± 0,28 (n=18)	m) 2,15 ± 0,21 (n=18)	

Tabelle 6: Einfluß von Glucose auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln an NAD von erwachsenen Ratten, von neugeborenen (5 Tage alten) Ratten und von foetalen Ratten (am 22. Tag der Schwangerschaft). Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Min. inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

Glucose mM	NADH / NAD		
	Erwachsene	Neugeborene	Foeten
0	a) 0,13	e) 0,11	i) 0,11
5,6	b) 0,15	f) 0,12	k) 0,13
11,1	c) 0,21	g) 0,17	l) 0,20
16,7	d) 0,23	h) 0,20	m) 0,26

Tabelle 7 : Einfluß von Glucose auf den NADH / NAD - Quotienten isolierter Pankreasinseln von erwachsenen Ratten, von neugeborenen (5 Tage alten) Ratten und von foetalen Ratten (am 22. Tag der Schwangerschaft).
Je 10 bzw. 5 Inseln wurden in 2 ml bzw. 1 ml Medium 15 Min. inkubiert.

Glucose mM	NADH + NAD pmol / 10 Inseln		
	Erwachsene	Neugeborene	Foeten
0	a) 5,54	e) 3,34	i) 2,56
5,6	b) 5,82	f) 3,89	k) 2,84
11,1	c) 5,45	g) 3,84	l) 3,03
16,7	d) 5,69	h) 3,61	m) 2,70

Tabelle 8: Einfluß von Glucose auf die Summe aus NADH und NAD isolierter Pankreasinseln von erwachsenen Ratten, von neugeborenen (5 Tage alten) Ratten und von foetalen Ratten (am 22. Tag der Schwangerschaft).
Je 10 bzw. 5 Inseln wurden in 2 ml bzw. 1 ml Medium 15 Min. inkubiert.

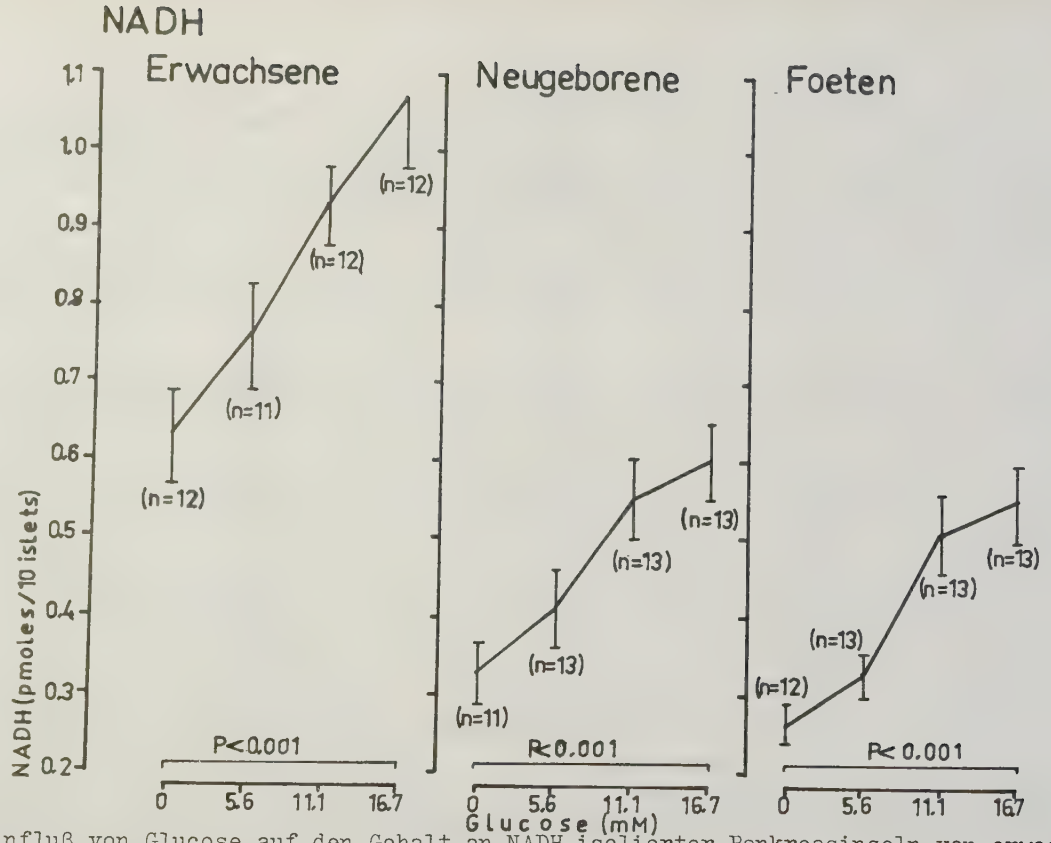


Abb.5: Einfluß von Glucose auf den Gehalt an NADH isolierter Pankreasinseln von erwachsenen Ratten, von neugeborenen (5 Tage alten) Ratten und von foetalen Ratten (am 22. Tag p.c.) Je 10 Inseln wurden in 2 ml Medium 15 Min. inkubiert.
Mittelwerte $\pm$ SEM; n = Anzahl der Versuche.

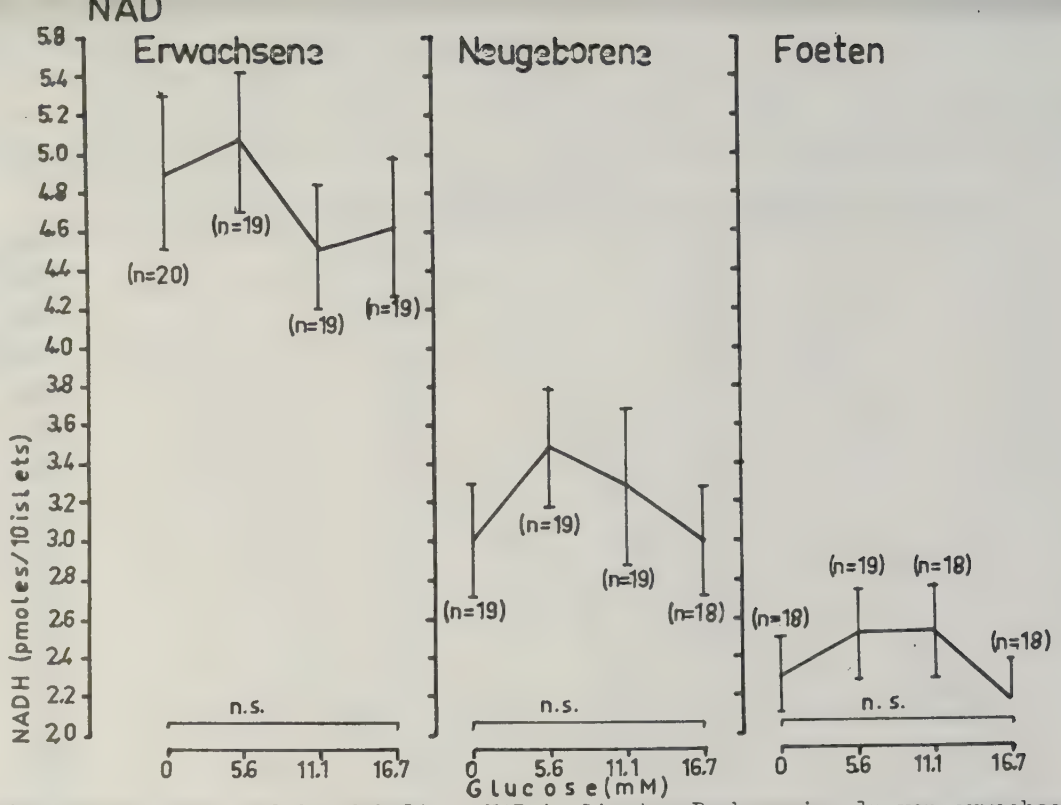


Abb.6: Einfluß von Glucose auf den Gehalt an NAD isolierter Pankreasinseln von erwachsenen Ratten, von neugeborenen (5 Tage alten) Ratten und von foetalen Ratten (am 22. Tag p.c.)
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 15 Min. inkubiert.
Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche.

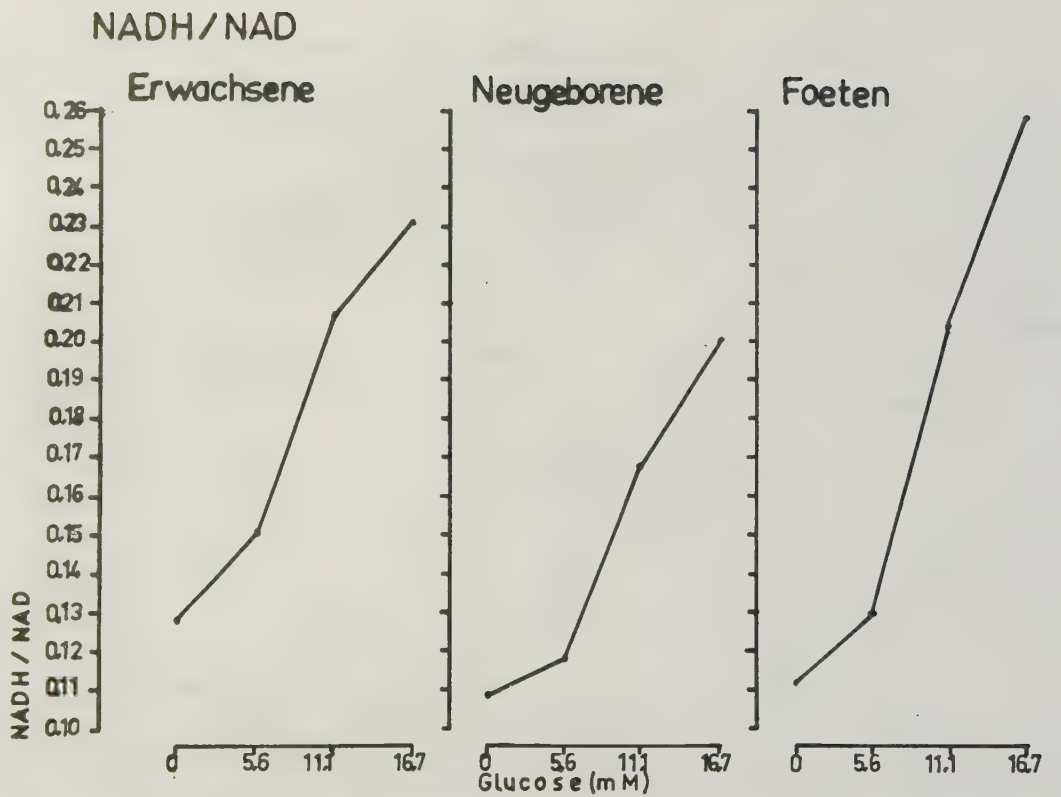


Abb.7: Einfluß von Glucose auf den NADH/NAD-Quotienten isolierter Pankreasinseln von erwachsenen Ratten, von neugeborenen (5 Tage alten) Ratten und von foetalen Ratten (am 22. Tag p.c.) Je 10 bzw. 5 Inseln wurden in 2 bzw. 1 ml Medium 15 Min. inkubiert. Mittelwerte $\pm$ SEM; n = Anzahl der Versuche.

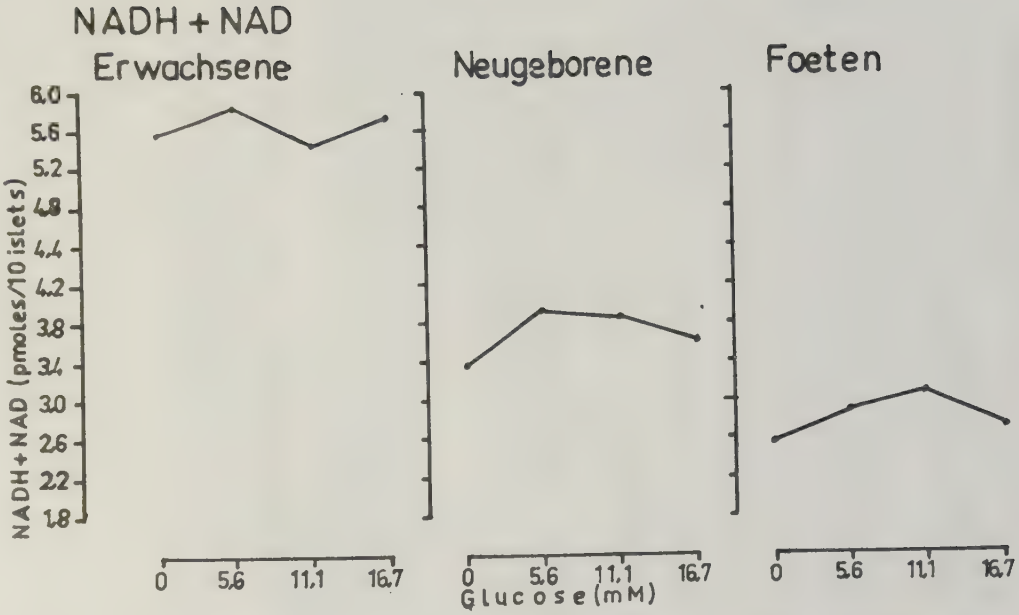


Abb.8: Einfluß von Glucose auf den Gehalt an NADH + NAD isolierter Pankreasinseln von erwachsenen Ratten, von neugeborenen (5 Tage alten) Ratten und von foetalen Ratten (am 22. Tag p.c.)
Je 10 bzw. 5 Inseln wurden in 2 bzw. 1 ml Medium 15 Min. inkubiert.

3.3. Einfluß von Glucose auf die Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln bei Erwachsenen, Neugeborenen und Foeten

Im Anschluß an die Messungen der Pyridinnukleotide wurde noch eine Untersuchung durchgeführt, wie sich unterschiedliche Dosen von Glucose in der Inkubationslösung auf die Insulinsekretion der Langerhansschen Inseln der erwachsenen, neugeborenen und foetalen Ratten auswirken.
Wie schon bei den Bestimmungen der Pyridinnukleotide wurden auch hier je 5 Inseln in 1 ml Medium ohne Glucose und mit 5,6 bzw. 11,1 bzw. 16,7 mM Glucose inkubiert.
Um meßbare Mengen des ins Medium sezernierten Insulins zu erhalten, mußte eine Inkubationsdauer von 90 Minuten gewählt werden.

Wie Versuche von M. Händel (91) zeigten, übt das während dieser Zeit in die Lösung abgegebene Insulin ein negatives feed-back auf die weitere Insulinsekretion der Insel aus.
Um dieser Gefahr vorzubeugen, wurde ein Insulinantikörper zugesetzt, der 1000 µE Insulin bindet. So war es möglich, die volle Sekretionsleistung der Insel während der Inkubationsdauer zu erfassen.

3.3.1. Erwachsenen Ratten

Um eigene Meßwerte unter identischen Versuchsbedingungen wie anschließend bei neugeborenen und foetalen Ratten als Vergleich zu erhalten, wurden zuerst Langerhanssche Inseln erwachsener Ratten mit unterschiedlicher Glucosekonzentration inkubiert und die sezernierte Insulinmenge bestimmt.

Tabelle 9 und Abbildung 9 machen deutlich, daß Glucose die Freisetzung von Insulin bei erwachsenen Tieren stimuliert.
Die Basalwerte der 10 Inseln ohne Glucose und mit 5,6 mM Glucose im Medium liegen in derselben Höhe von 240 µE Insulin. Im stimulatorischen Bereich von 11,1 mM Glucose im Inkubationsmedium steigt die Insulinsekretion auf 892 µE Insulin pro 10 Inseln an und erreicht mit 2156 µE Insulin pro 10 Inseln in Anwesenheit von 16,7 mM Glucose ihren höchsten Wert (siehe Tabelle 9 und Abbildung 9).
Die dosisabhängige Steigerung der Insulinsekretion erweist sich als statistisch signifikant gegenüber dem Kontrollwert und dem Wert bei 5,6 mM Glucose.

3.3.2. Neugeborene, 5 Tage alte Ratten

Bei der Bestimmung der Insulinmenge, die von den Langerhansschen Inseln der neugeborenen Ratten 5 Tage nach der Geburt ins Inkubationsmedium abgegeben wird, zeigt sich eine deutliche Zunahme in Abhängigkeit von steigender Glucosekonzentration.

In Abwesenheit von Glucose und bei 5,6 mM Glucose im Medium sezernieren die 10 Inseln der neugeborenen Tiere im Mittel 212 µE bzw. 208 µE Insulin, wie Tabelle 10 und Abb. 10 zu entnehmen ist.
Bei Zusatz von 11,1 mM Glucose findet man schon mehr als das Doppelte an sezerniertem Insulin: 468 µE von je 10 Inseln.
Wie aus der Tabelle 10 und Abbildung 10 klar zu ersehen ist, verdoppelt sich auch bei weiterer Erhöhung der Glucosekonzentration auf 16,7 mM die Insulinausschüttung der Inseln wiederum fast und beträgt 882 µE Insulin bezogen auf je 10 Inseln.

Die beiden letzteren Werte unterscheiden sich statistisch signifikant sowohl voneinander, als auch von den beiden ersteren.

3.3.3. Foetale Ratten

Im foetalen Stadium der Ratten kurz vor der Geburt ergeben die Messungen, daß die Langerhansschen Inseln unter dem Einfluß verschiedener Glucosemengen keine Stimulierbarkeit der Insulinsekretion aufweisen.

Betrachtet man die Meßwerte im einzelnen in Tabelle 11 und Abbildung 11, so findet man in Abwesenheit von Glucose in der Lösung eine sezernierte Insulinmenge von 80 µE pro 10 Inseln.
In Anwesenheit von 5,6 mM und 11,1 mM Glucose wird etwas weniger, nur 76 µE Insulin, und bei weiterer Erhöhung der Glucose auf 16,7 mM sogar nur 74 µE Insulin von je 10 Inseln ausgeschüttet.
Diese Ergebnisse unterscheiden sich jedoch nicht signifikant voneinander.
Wie Tabelle 11 und Abbildung 11 veranschaulichen, liegt die Insulinmenge bei jeder Glucosekonzentration konstant auf derselben Höhe.

3.3.4. Erwachsene - Neugeborene - Foeten

Stellt man die Meßergebnisse der drei Altersgruppen gegenüber, so läßt sich eindeutig die Feststellung treffen, daß bei den erwachsenen und den neugeborenen, 5 Tage alten Ratten die Insulinsekretion dosisabhängig mit der Glucosekonzentration steil ansteigt, während diese bei den foetalen Ratten durch Glucose nicht beeinflußt wird (vgl. Tab. und Abb. 9, 10, 11).

Die Langerhansschen Inseln der Erwachsenen und Neugeborenen sezernieren ohne bzw. mit 5,6 mM Glucose im Inkubationsmedium etwa die gleiche Menge Insulin.

In Anwesenheit von 11,1 mM und 16,7 mM Glucose ist jedoch das Sekretionsvermögen der erwachsenen Inseln in etwa doppelt so hoch wie das der neugeborenen. Die Erwachsenen schütten bei 11,1 mM Glucose bereits so viel Insulin aus, wie die Neugeborenen bei maximaler Stimulation mit 16,7 mM Glucose.

Die Ursache hierfür liegt sicherlich in dem Größenunterschied der ß-Zelle begründet.
Während demnach die Neugeborenen in der Basalsekretion bereits auf der Höhe der Erwachsenen liegen, setzen die Inseln der foetalen Tiere, sicherlich auch bedingt durch die geringere Größe, nur knapp die Hälfte an Insulin frei und besitzen auch noch nicht die Fähigkeit, diese zu steigern.

Glucose mM	Gesamtinsulin µE / 10 Inseln	statistische Auswertung
0	a) 240 ± 52 (n=15)	ac: P < 0,01 ad: P < 0,001 bc: P < 0,01 bd: P < 0,001 cd: P < 0,001
5,6	b) 240 ± 40 (n=14)	
11,1	c) 892 ± 200 (n=14)	
16,7	d) 2156 ± 246 (n=15)	

Tabelle 9: Einfluß von Glucose auf die Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln von erwachsenen Ratten. Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Min. in Anwesenheit von Insulinantikörper inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche.

Glucose mM	Gesamtinsulin µE / 10 Inseln	statistische Auswertung
0	a) 212 ± 32 (n=22)	ac: P < 0,001 ad: P < 0,001 bc: P < 0,001 bd: P < 0,001 cd: P < 0,001
5,6	b) 208 ± 34 (n=22)	
11,1	c) 468 ± 52 (n=22)	
16,7	d) 882 ± 72 (n=22)	

Tabelle 10: Einfluß von Glucose auf die Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln von neugeborenen (5 Tage alten) Ratten.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Min. in Anwesenheit von Insulinantikörper inkubiert.
Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche.

Glucose mM	Gesamtinsulin µE / 10 Inseln	statistische Auswertung
0	a) 80 ± 18 (n=17)	ab: n.s. ac: n.s. ad: n.s. bc: n.s. bd: n.s. cd: n.s.
5,6	b) 76 ± 12 (n=17)	
11,1	c) 76 ± 16 (n=16)	
16,7	d) 74 ± 16 (n=17)	

Tabelle 11: Einfluß von Glucose auf die Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln von foetalen Ratten (am 22. Tag der Schwangerschaft).
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Min. in Anwesenheit von Insulinantikörper inkubiert.
Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

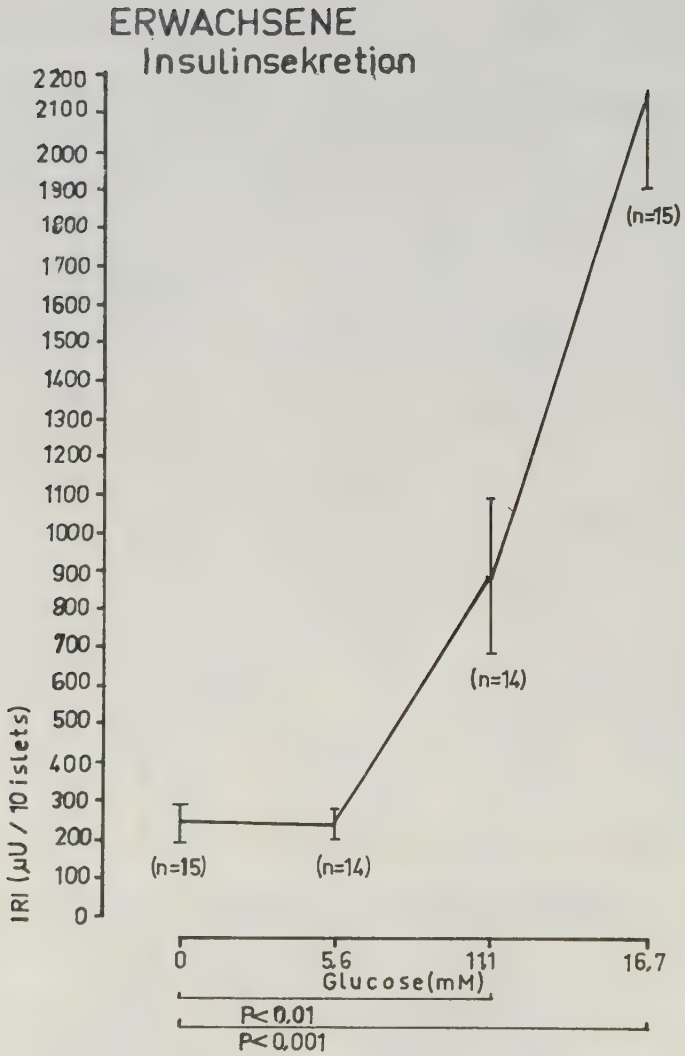


Abb.9: Einfluß von Glucose auf die Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln von erwachsenen Ratten.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Min. in Anwesenheit von Insulinantikörper inkubiert.
Mittelwerte $\pm$ SEM; n = Anzahl der Versuche.

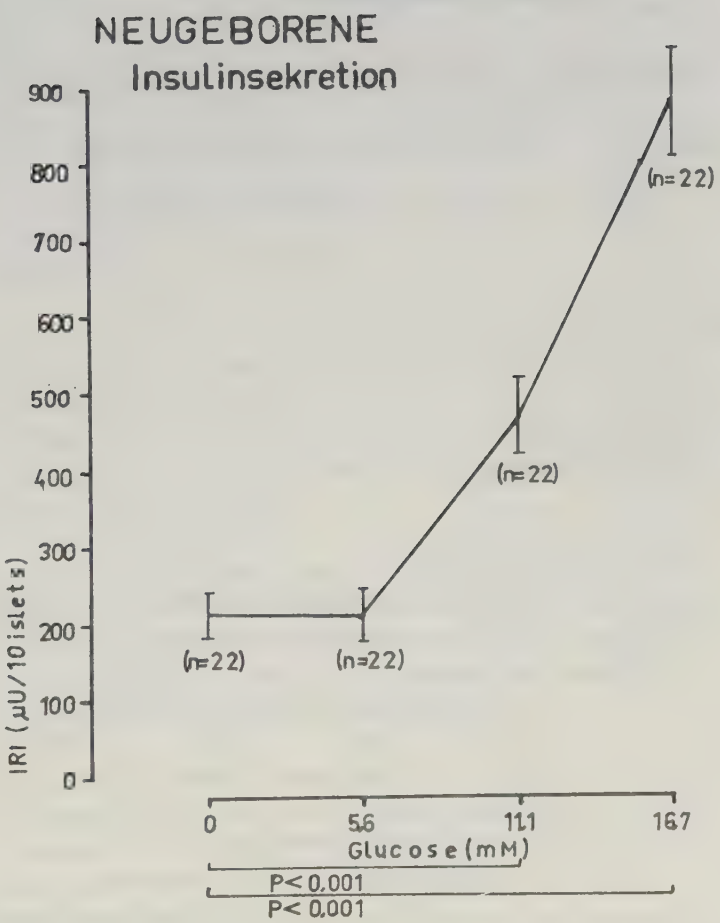


Abb.10: Einfluß von Glucose auf die Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln von neugeborenen (5 Tage alten) Ratten. Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Min. in Anwesenheit von Insulinantikörper inkubiert.
Mittelwerte $\pm$ SEM; n = Anzahl der Versuche.

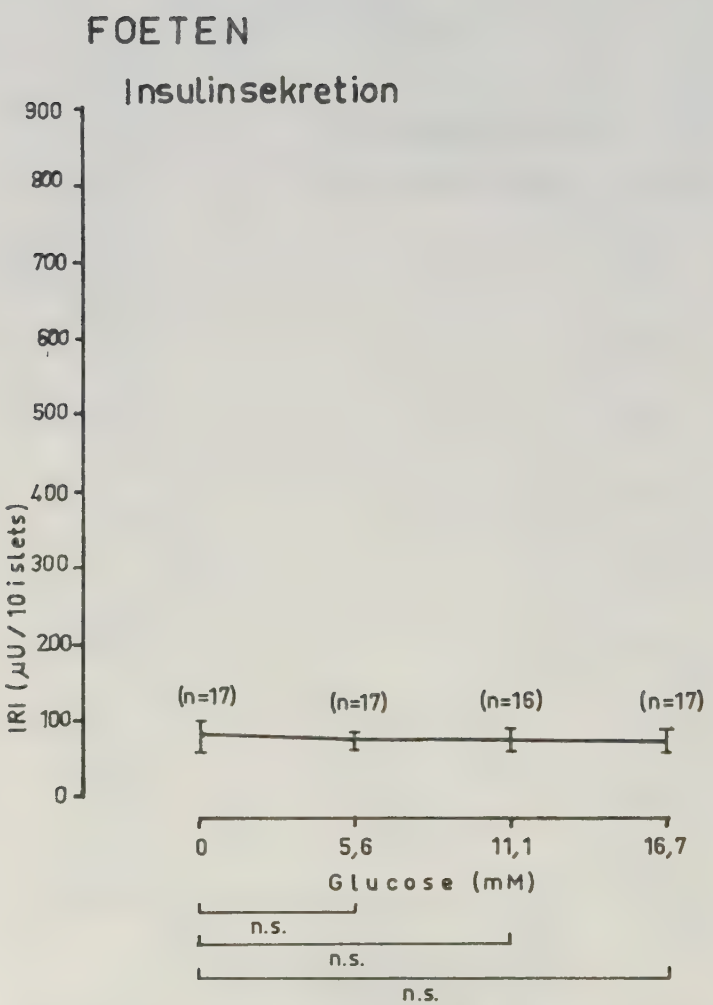


Abb.11: Einfluß von Glucose auf die Insulinsekretion isolierter Pankreasinseln von foetalen Ratten (am 22. Tag p.c.) Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 min. in Anwesenheit von Insulinantikörper inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche.

3.4. Einfluß des Alters von 2 Jahren auf den NADPH- und NADP- Gehalt und den NADPH/NADP - Quotienten isolierter Langerhansscher Inseln der Ratte

3.4.1. Versuche mit Glucose

Zur Untersuchung der Frage, ob das Alter einen Einfluß auf den Redoxzustand der phosphorylierten Pyridinnukleotide der Inseln bei Steigerung der Glucosekonzentration ausübt, wurden gleichzeitig Messungen an Inseln drei Monate alter und zwei Jahre alter Ratten durchgeführt.

Es wurden je 5 Inseln mit 1 ml Medium während einer Zeit von 90 Minuten inkubiert. Dem Versuchsansatz wurde ein Insulinantikörper zugesetzt, da aus früheren Untersuchungen bekannt war, daß sezerniertes Insulin zur Abnahme des insulären NADPH führt (41).

Die längere Inkubationszeit wurde gewählt, um innerhalb des Arbeitskreises gleiche Untersuchungsbedingungen einzuhalten, da die dort durchgeführten Messungen der Insulinsekretion und des PPS nur bei einer längeren Inkubationsdauer möglich waren.
Dem Inkubationsmedium wurden, wie auch schon bei den vorhergehenden Versuchen, 5,6mM bzw. 11,1mM bzw. 16,7mM Glucose zugesetzt.

Wie der Tabelle 12 und Abbildung 12 entnommen werden kann, bewirkt Glucose bei zwei Jahre alten Tieren wie bei drei Monate alten eine dosisabhängige Steigerung des insulären NADPH- Gehalts.
Die NADPH- Konzentration steigt statistisch signifikant von 0,91 pmol bei 5,6 mM Glucose auf 1,44 pmol in 10 Inseln alter Tiere in Gegenwart von 16,7 mM Glucose im Medium (siehe Tabelle 12 und Abb. 12).
Im Vergleich dazu findet man bei den drei Monate alten Tieren (vgl. Tabelle 12 und Abb. 12) einen signifikanten Anstieg des NADPH- Gehalts der Inseln unter dem Einfluß von Glucose im gleichen Ausmaß, ebenfalls von 0,89 pmol auf 1,44 pmol in 10 Inseln bei 5,6 mM bzw. 16,7 mM Glucose im Medium.
Ein signifikanter Unterschied zwischen Alt und Jung ist statistisch nicht nachzuweisen.

Analoge Beobachtungen wurden bei den Untersuchungen des Gehalts an NADP Langerhansscher Inseln zwei Jahre alter Ratten im Vergleich zu jungen Tieren gemacht, wie Tabelle 13 und Abbildung 13 zeigen.
Bei alten wie bei jungen Tieren liegt der insuläre NADP- Gehalt in Gegenwart von substimulatorischer Glucosemenge (5,6 mM) bei 1,48 pmol bezogen auf 10 Inseln. Er sinkt bei den Inseln alter Ratten aufgrund der Stimulation mit 16,7 mM Glucose ab auf 1,14 pmol pro 10 Inseln.
Die jungen Ratten zeigen einen etwas stärkeren Abfall des NADP- Gehalts auf 0,92 pmol in 10 Inseln in Anwesenheit von 16,7 mM Glucose (siehe Tabelle 13 und Abbildung 13).

In jedem Fall unterscheiden sich die Werte bei stimulatorischer Menge Glucose statistisch signifikant von denen bei substimulatorischer.
Der Unterschied zwischen den Werten der alten und jungen Tiere ist statistisch nicht signifikant.
Entsprechend dazu stieg auch der NADPH/NADP-Quotient dosisabhängig von der Glucosemenge in beiden Altersstufen an (siehe Tabelle 14 und Abbildung 14).
Der NADPH/NADP-Quotient betrug, wie der Tabelle 14 und Abb. 14 zu entnehmen ist, bei alten und bei jungen Ratten 0,61 in Gegenwart von 5,6 mM Glucose. Der Anstieg auf 1,0 durch Stimulation mit 11,1 mM Glucose lief ebenfalls noch parallel. Nur die Werte bei 16,7 mM Glucose differieren gering, indem sie mit 1,56 bei den Jungen etwas über den Alten mit 1,26 liegen.

Bildet man die Summe aus dem insulären NADPH- und NADP-Gehalt bei den alten und den jungen Tieren, so liegt sie bei beiden etwa in derselben Höhe. Der Kontrollwert ohne Glucosezugabe liegt bei beiden etwas unter den Werten in Gegenwart von Glucose. Bei den Jungen beträgt er 2,08 pmol in 10 Inseln, bei den Alten 2,29 (siehe Tabelle 15 und Abb. 15), was möglicherweise auf die Verarmung an Substrat während der langen Inkubationsdauer zurückzuführen ist. Wie Tabelle 15 und Abb. 15 zu entnehmen ist, enthalten die 10 Inseln junger Ratten unabhängig von steigender Glucosekonzentration im Medium praktisch gleichbleibend etwa 2,3 pmol NADPH + NADP, während der Gehalt bei den Alten leicht ansteigt von 2,39 auf 2,55 und 2,58 pmol NADPH + NADP in je 10 Inseln bei 5,6, 11,1 und 16,7 mM Glucose.

Glucose mM	NADPH pmol / 10 Inseln		statistische Auswertung:
	Alte	Junge	
0	a) 0,68 ± 0,05 (n=30)	e) 0,70 ± 0,05 (n=30)	ab: P<0,02 ac: P<0,001 ad: P<0,001 bc: P<0,01 bd: P<0,001
5,6	b) 0,91 ± 0,08 (n=30)	f) 0,89 ± 0,05 (n=29)	ef: P<0,01 eg: P<0,001 eh: P<0,001 fg: P<0,01 fh: P<0,001 gh: P<0,05
11,1	c) 1,30 ± 0,10 (n=31)	g) 1,16 ± 0,08 (n= 29)	ae: n.s. bf: n.s. cg: n.s. dh: n.s.
16,7	d) 1,44 ± 0,09 (n=29)	h) 1,44 ± 0,09 (n=31)	

Tabelle 12: Einfluß von Glucose auf den Gehalt an NADPH von isolierten Pankreasinseln 2 Jahre alter Ratten im Vergleich zu jungen (3 Monate alten) Ratten.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium mit Insulinantikörperzusatz inkubiert.
Mittelwerte ± SEM; n= Anzahl der Versuche.

Glucose mM	NADP pmol / 10 Inseln		statistische Auswertung:
	Alte	Junge	
0	a) 1,61 ± 0,15 (n=21)	e) 1,38 ± 0,14 (n=17)	ac: n. s. ad: P<0,02 bc: n. s. bd: P<0,02
5,6	b) 1,48 ± 0,10 (n=21)	f) 1,47 ± 0,15 (n=20)	eg: n. s. eh: P<0,01 fg: n. s. fh: P<0,01
11,1	c) 1,25 ± 0,09 (n= 19)	g) 1,14 ± 0,09 (n= 20)	ae: n.s. bf: n.s. cg: n.s. dh: n.s.
16,7	d) 1,14 ± 0,1o (n=19)	h) 0,92 ± 0,06 (n=21)	

Tabelle 13: Einfluß von Glucose auf den Gehalt an NADP von isolierten Pankreasinseln 2 Jahre alter Ratten im Vergleich zu jungen (3 Monate alten) Ratten.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Min. mit Insulinantikörperzusatz inkubiert.
Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche.

Glucose (mM)	NADPH / NADP	
	Alte	Junge
0	a) 0,42	e) 0,51
5,6	b) 0,61	f) 0,61
11,1	c) 1,01	g) 1,02
16,7	d) 1,26	h) 1,56

Tabelle 14: Einfluß von Glucose auf den NADPH / NADP - Quotienten von isolierten Pankreasinseln 2 Jahre alter Ratten im Vergleich zu jungen (3 Monate alten) Ratten.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Min. mit Insulinantikörperzusatz inkubiert.

Glucose (mM)	NADPH + NADP pmol/10 Inseln	
	Alte	Junge
0	a) 2,29	e) 2,08
5,6	b) 2,39	f) 2,36
11,1	c) 2,55	g) 2,30
16,7	d) 2,58	h) 2,36

Tabelle 35: Einfluß von Glucose auf die Summe an NADPH + NADP von isolierten Pankreasinseln 2 Jahre alter Ratten im Vergleich zu jungen (3 Monate alten) Ratten. Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium mit Insulinantikörperzusatz inkubiert.

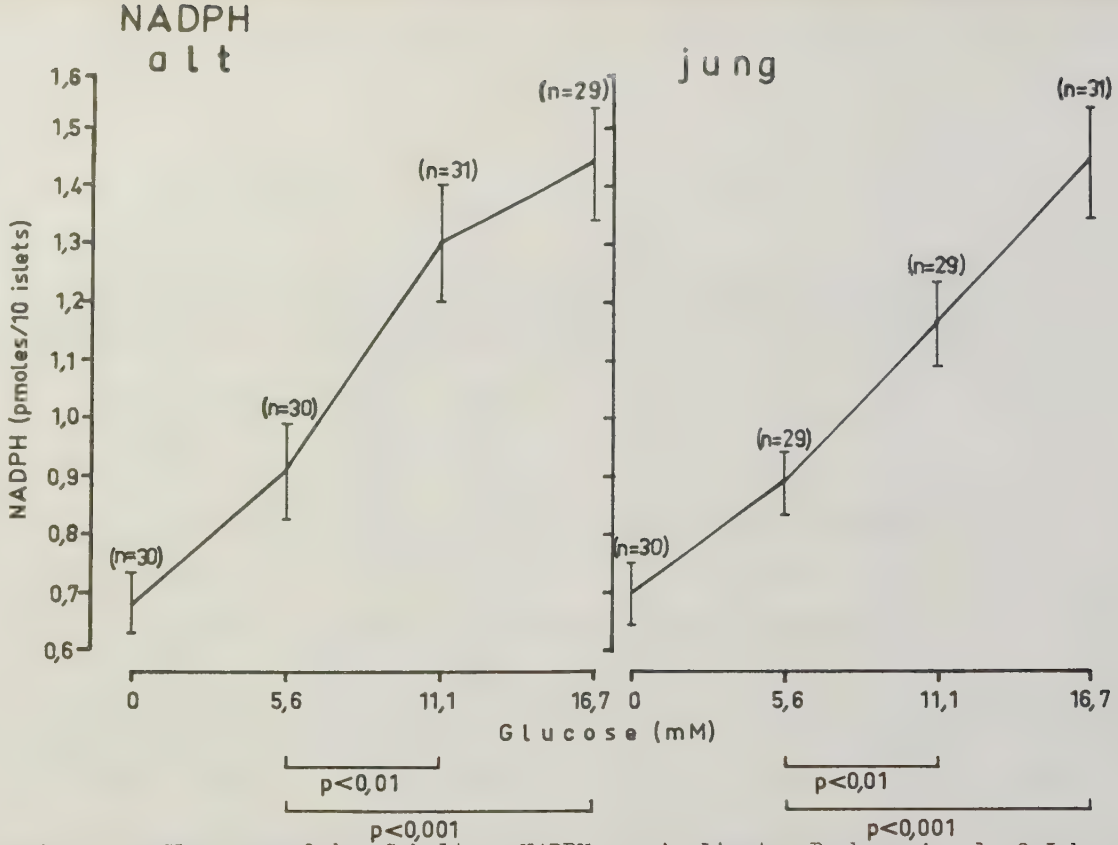


Abb.12: Einfluß von Glucose auf den Gehalt an NADPH von isolierten Pankreasinseln 2 Jahre alter Ratten im Vergleich zu jungen (3 Monate alten) Ratten.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Min. mit Insulinantikörperzusatz inkubiert.
Mittelwerte $\pm$ SEM; n = Anzahl der Versuche.

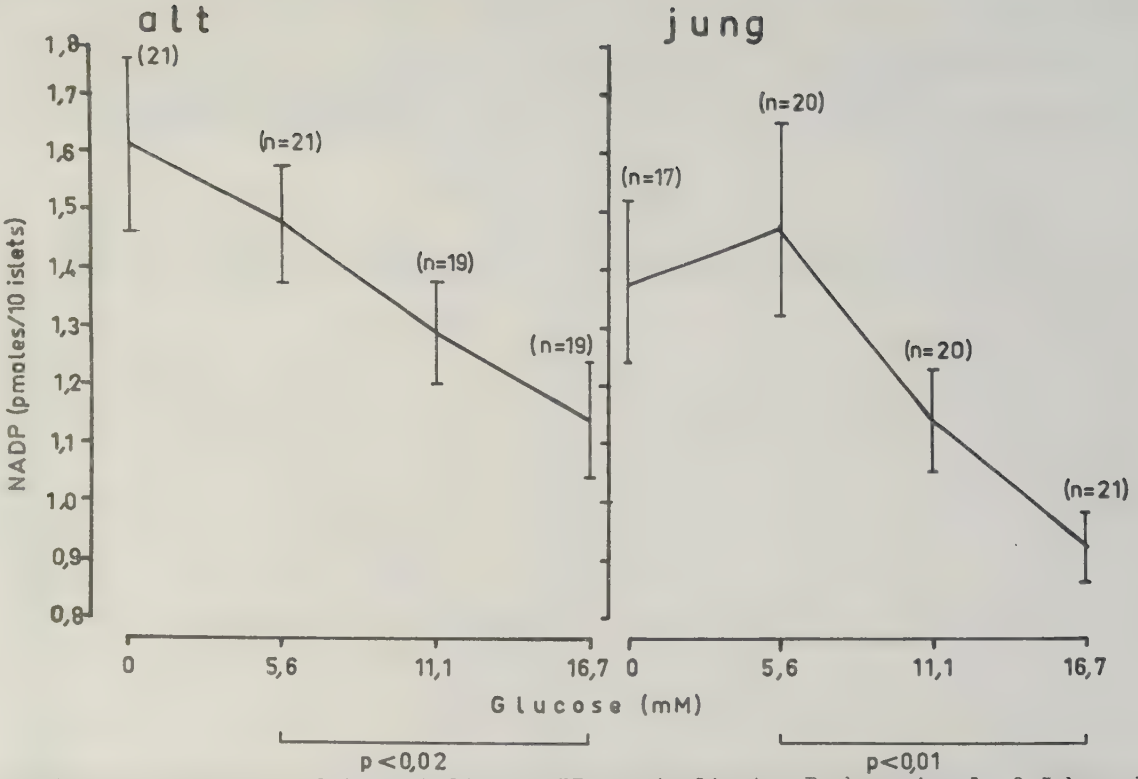


Abb.13: Einfluß von Glucose auf den Gehalt an NADP von isolierten Pankreasinseln 2 Jahre alter Ratten im Vergleich zu jungen (3 Monate alten) Ratten.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Min. mit Insulinantikörperzusatz inkubiert.
Mittelwerte $\pm$ SEM; n = Anzahl der Versuche.

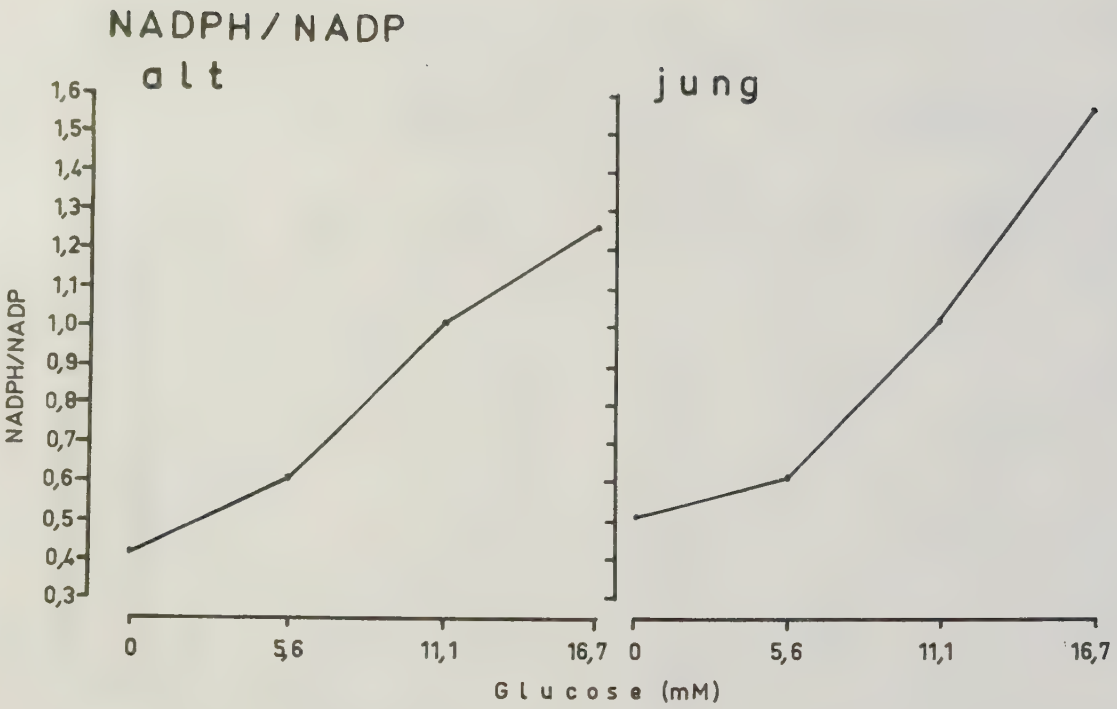


Abb.14: Einfluß von Glucose auf den NADPH/NADP-Quotienten von isolierten Pankreasinseln 2 Jahre alter Ratten im Vergleich zu jungen (3Monate alten) Ratten. Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Min. mit Insulinantikörperzusatz inkubiert.

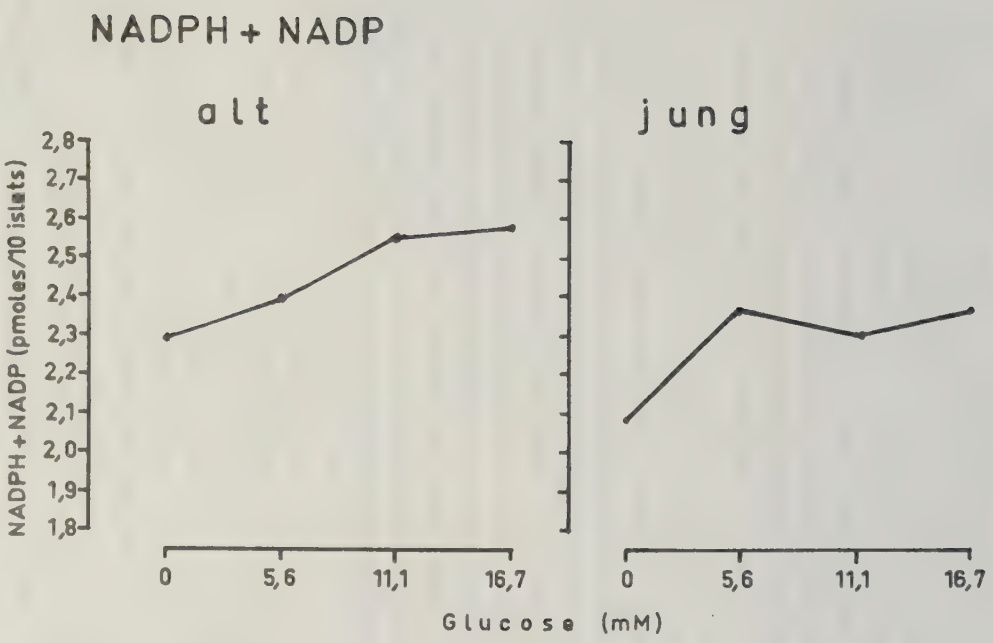


Abb.15: Einfluß von Glucose auf den Gehalt an NADPH + NADP von isolierten Pankreasinseln 2 Jahre alter Ratten im Vergleich zu jungen (3 Monate alten) Ratten. Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Min. mit Insulinantikörperzusatz inkubiert.

3.4.2. Versuche mit Leucin

Auch die Stimulation mit 10mM Leucin führte bei 90minütiger Inkubation von 5 Inseln in 1 ml Medium in Gegenwart von Insulinantikörper zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich des insulären Stoffwechsels der phosphorylierten Pyridinnukleotide bei jungen und alten Tieren wie die Stimulation mit Glucose allein.
Wie Tabelle 16 und Abbildung 16 zeigen, bewirkt Leucin (10 mM) in Gegenwart von Glucose (5,6 mM) bei den drei Monate alten Tieren einen signifikanten Anstieg des NADPH auf 1,14 pmol/10 Inseln im Vergleich zu 0,91 pmol/10 Inseln mit Glucose (5,6 mM) allein. Ein ähnlich starker und statistisch signifikanter Anstieg wurde auch bei den Inseln zwei Jahre alter Tiere beobachtet. Hier steigt der NADPH- Gehalt in 10 Inseln von 0,89 nur mit Glucose auf 1,12 pmol mit Leucin als Stimulans (vgl. Tabelle 16 und Abb.16).

Tabelle 16 und Abbildung 17 machen deutlich, daß auch der insuläre NADP- Gehalt unter dem Einfluß von Leucin in beiden Altersgruppen absinkt.
Bei der Glucosekonzentration von 5,6 mM führten 10 mM Leucin bei Inseln junger Ratten zu einer signifikanten Abnahme des NADP- Gehaltes von 1,47 pmol auf 1,10 pmol in 10 Inseln.
Der NADP- Gehalt alter Ratten wurde durch 10 mM Leucin und 5,6 mM Glucose im selben Ausmaß von 1,47 pmol auf 1,15 pmol in 10 Inseln gesenkt (siehe Tabelle 16 und Abbildung 17).

Aus Tabelle 17 und Abbildung 18 ist zu entnehmen, daß der NADPH/NADP - Quotient bei jungen wie bei alten Tieren nahezu im identischen Umfang ansteigt.
In Anwesenheit von 5,6 mM Glucose liegt der NADPH/NADP-Quotient bei 0,61 sowohl bei jungen, als auch bei alten Tieren.
In Gegenwart von zusätzlich 10 mM Leucin erhöht sich der Wert auf 1,02 bei Inseln der drei Monate alten und auf 0,99 bei Inseln der zwei Jahre alten Ratten (siehe Tabelle 17 und Abbildung 18).

An der Summe aus NADPH und NADP in den Inseln der alten und jungen Tiere ändert sich jedoch, wie aus Tabelle 17 und Abbildung 19 zu ersehen ist, unter dem Einfluß von Leucin 10 mM in Gegenwart von 5,6 mM Glucose nichts.
Der Gesamtgehalt der Inseln an NADPH und NADP beträgt im Alter von zwei Jahren 2,39 pmol, bei Jungen 2,36 pmol allein mit Glucose 5,6 mM und nur unwesentlich weniger, 2,29 pmol bei den alten, 2,22 pmol bei den jungen Tieren, wenn Leucin 10 mM hinzugefügt wird (vgl..Tabelle 17 und Abbildung 19).

	NADPH		NADP	
	Alt	Jung	Alt	Jung
Glucose 5,6 mM	a) 0,91 ± 0,08 (n=30)	c) 0,89 ± 0,05 (n=29)	e) 1,48 ± 0,10 (n=21)	g) 1,47 ± 0,15 (n=20)
Glucose 5,6 mM + Leucin 10 mM	b) 1,14 ± 0,07 (n=32)	d) 1,12 ± 0,08 (n=32)	f) 1,15 ± 0,09 (n=18)	h) 1,10 ± 0,07 (n=17)
statistische Auswertung:	ab: P<0,05 cd: P<0,02		ef: P<0,05 gh: P<0,05	

Tabelle 16: Einfluß von Glucose und Leucin auf den Gehalt an NADPH und NADP von isolierten Pankreasinseln 2 Jahre alter Ratten im Vergleich zu jungen (3 Monate alten) Ratten. Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium mit Insulinantikörperzusatz 90 Min. inkubiert. Mittelwerte ± SEM; n = Anzahl der Versuche

	NADPH / NADP		NADPH + NADP	
	Alt	Jung	Alt	Jung
Glucose 5,6 mM	a) 0,61	c) 0,61	e) 2,39	g) 2,36
Glucose 5,6 mM + Leucin 10 mM	b) 0,99	d) 1,02	f) 2,29	h) 2,22

Tabelle 10 : Einfluß von Glucose und Leucin auf den NADPH / NADP - Quotienten und die Summe aus NADPH + NADP von isolierten Pankreasinseln 2 Jahre alter Ratten im Vergleich zu jungen (3Monate alten) Ratten.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium mit Insulinantikörperzusatz 90 Min. inkubiert.

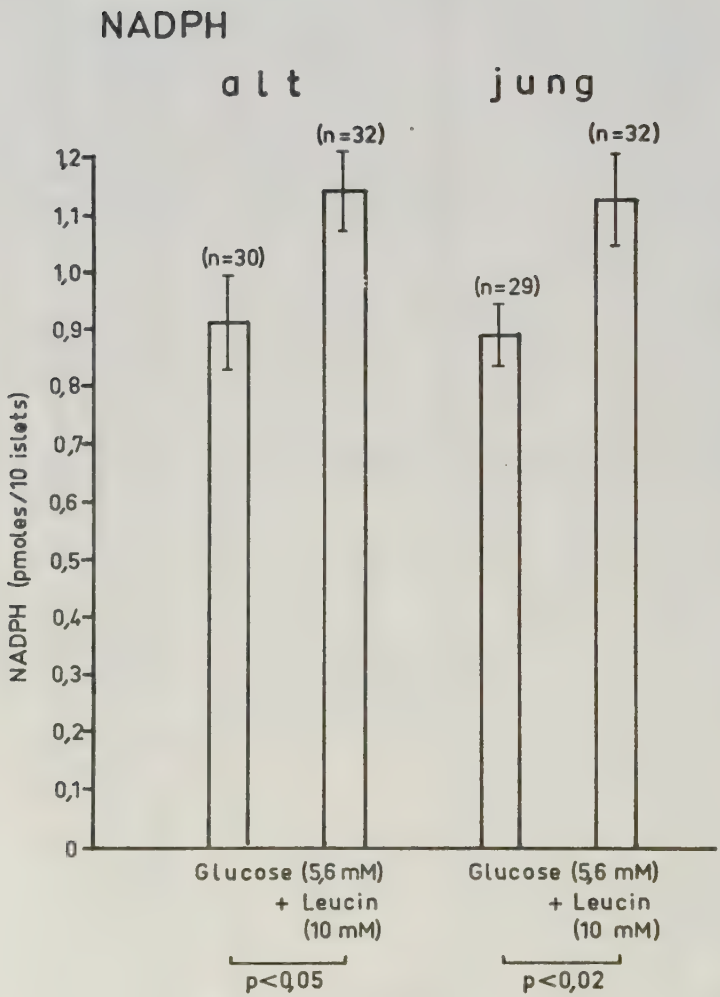


Abb.16: Einfluß von Glucose und Leucin auf den Gehalt an NADPH von isolierten Pankreasinseln 2 Jahre alter Ratten im Vergleich zu jungen (3 Monate alten) Ratten.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Min. mit Insulinantikörperzusatz inkubiert.
Mittelwerte $\pm$ SEM; n = Anzahl der Versuche.

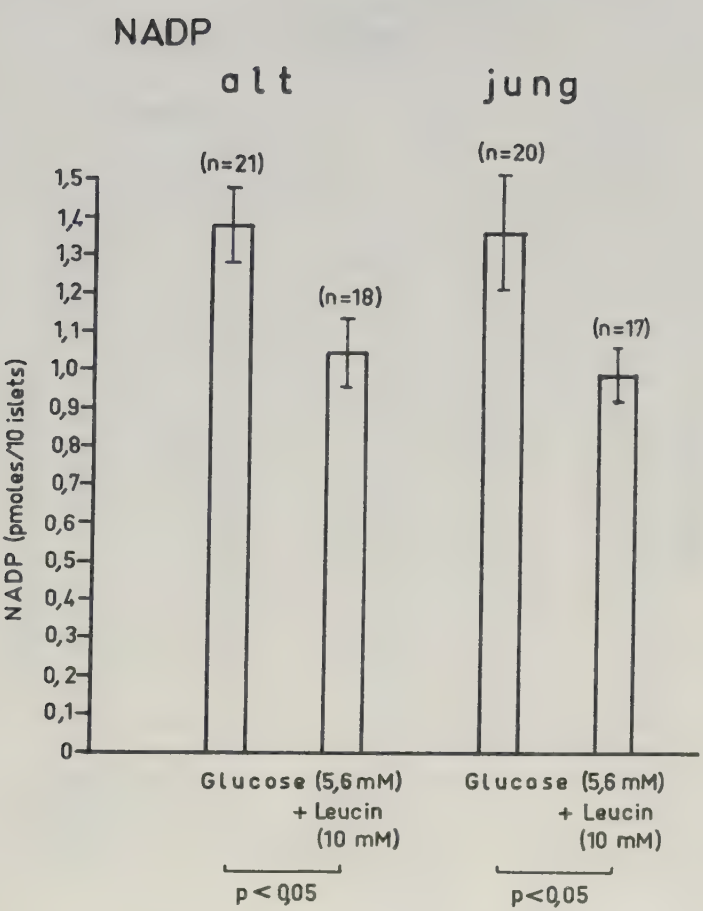


Abb.17: Einfluß von Glucose und Leucin auf den Gehalt an NADP von isolierten Pankreasinseln 2 Jahre alter Ratten im Vergleich zu jungen (3 Monate alten) Ratten. Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Min. mit Insulinantikörperzusatz inkubiert. Mittelwerte $\pm$ SEM; n = Anzahl der Versuche.

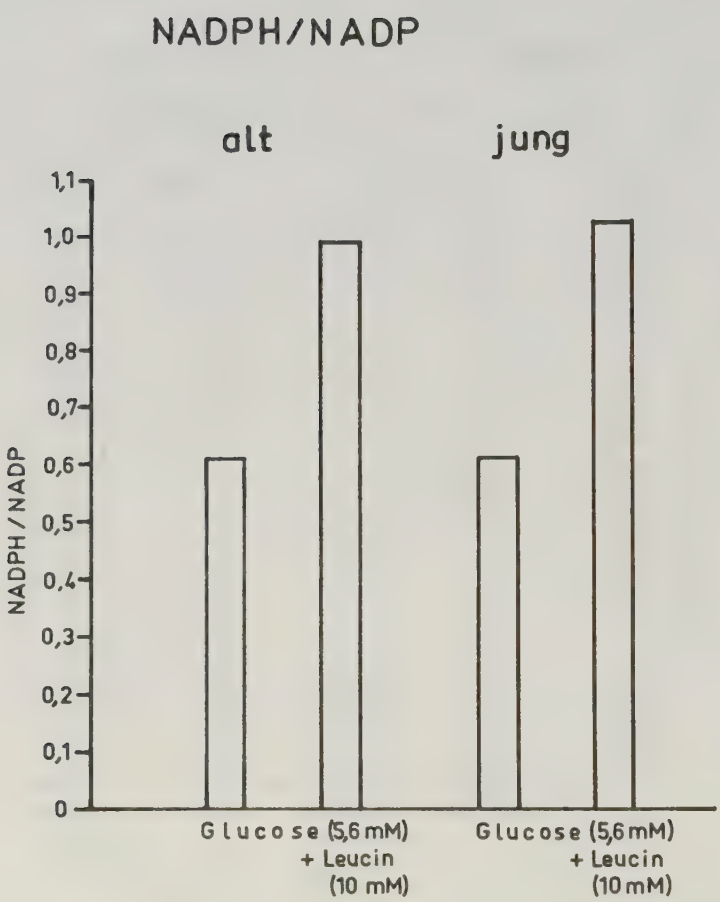


Abb.18: Einfluß von Glucose und Leucin auf den NADPH/NADP-Quotienten von isolierten Pankreasinseln 2 Jahre alter Ratten im Vergleich zu jungen (3 Monate alten) Ratten.
Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Min. mit Insulinantikörperzusatz inkubiert.

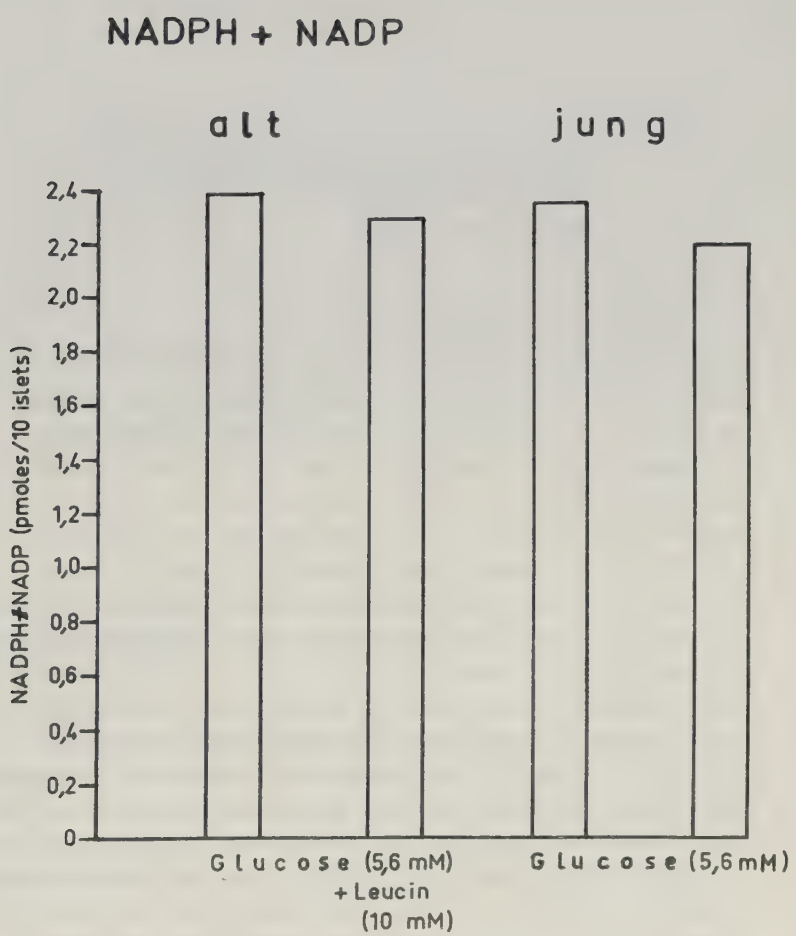


Abb.19: Einfluß von Glucose und Leucin auf den Gehalt an NADPH + NADP von isolierten Pankreasinseln 2 Jahre alter Ratten im Vergleich zu jungen (3 Monate alten). Je 5 Inseln wurden in 1 ml Medium 90 Min. mit Insulinantikörperzusatz inkubiert.

4. Diskussion

4.1. Biosynthese und Sekretion von Insulin bei Neugeborenen und Foeten

4.1.1. Biosynthese

Im Pankreas von Rattenfoeten kann bereits am 11,5. Tag p.c. die Synthese von Proinsulin nachgewiesen werden (92). Ab dem 14. Tag findet eine Umwandlung von Proinsulin in Insulin statt, welches in der B-Zelle gespeichert wird (93).
Im Blut des Foeten dagegen ist Insulin erst ab dem 17. Tag p.c. feststellbar (94).
Es scheint demzufolge, daß die foetale ß-Zelle schon in einem frühen Entwicklungsstadium die Fähigkeit besitzt, Proinsulin zu bilden.
Untersuchungen von Freie, Pasma, Bouman (95) weisen einen Anstieg im Insulingehalt des Inselgewebes bei foetalen Ratten in den letzten vier Tagen der Schwangerschaft nach, während dieser in den Tagen nach der Geburt nicht mehr zunimmt. Man kann daraus schließen, daß die qualitative Reifung der Insel als Insulin produzierende Einheit am letzten Tag der Schwangerschaft bereits erreicht ist.
Die Biosynthese von Insulin wird im foetalen Stadium durch Glucose stimuliert, wie Asplund nachgewiesen hat (96). Auch Heinze et al. (84) konnten bestätigen, daß die foetale Insel Glucose als Stimulans der Insulinbiosynthese erkennt.

Hieraus ergibt sich, daß die nicht vorhandene oder nur geringe Insulinantwort der ß-Zelle von Foeten auf Glucosestimulation nicht auf einen Mangel an neusynthetisiertem Hormon zurückzuführen ist.

4.1.2. Einfluß verschiedener Stimulantien auf die Insulinsekretion bei Neugeborenen und Foeten

4.1.2.1. Einfluß von Glucose

Wie schon in der Einleitung beschrieben, findet die Mehrzahl der Autoren kein oder nur ein sehr geringes Vermögen der Langerhansschen Insel im foetalen Stadium, auf die Stimulation mit Glucose mit einer erhöhten Insulinfreisetzung zu antworten (5,8,9,10,11,12). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diese Befunde.
Die angegebenen Messungen der Insulinsekretion wurden in dieser Arbeit unter Zusatz eines Insulinantikörpers durchgeführt, um ein negatives feed-back des ins Medium sezernierten Insulins im Lauf der Inkubationsdauer (91) zu verhindern.
Die basal sezernierte Insulinmenge ohne Glucosezusatz liegt bei 21 Tage alten Rattenfoeten und bei fünf Tage alten neugeborenen Ratten etwa gleich hoch.
Unter dem Einfluß von 16,7 mM Glucose ist bei den Foeten keine Erhöhung der freigesetzten Insulinmenge zu beobachten.

Bei den Neugeborenen dagegen zeigt sich eine dosisabhängige Steigerung der Insulinsekretion, die absolut gesehen unter den Werten der erwachsenen Tiere liegt, was jedoch sicher durch die unterschiedliche Größe der Langerhansschen Inseln bedingt ist, aber auch dadurch zu erklären sein könnte, daß der Sekretionsmechanismus zwar vorhanden, aber noch nicht voll entwickelt ist.

Mit Hilfe der Perifusion der Langerhansschen Inseln besteht die Möglichkeit, auf die Dynamik der Insulinsekretion im perinatalen Stadium näher einzugehen. Asplund (97) stellte nach der Perifusion von Pankreasstücken fest, daß Foeten am 21. Tag p.c. nach Stimulierung mit Glucose nur einen kleinen ersten Peak der Insulinsekretion, jedoch keinen zweiten Peak zeigen.
Am ersten Tag p.p. erfolgt zusätzlich eine schwach ausgeprägte zweite Sekretionsphase. Am sechsten Tag p.p. tritt ein gut ausgebildeter erster Peak und eine deutliche zweite Phase der Insulinsekretion auf, ähnlich wie bei erwachsenen Ratten.
Auch Hellerström et al. (98) beschreiben dieselben Ergebnisse: bei Foeten ist nur ein kleiner erster Peak, bei sechs Tage alten Neugeborenen dagegen ein biphasischer Insulinsekretionsverlauf zu verzeichnen.
Daraus läßt sich ableiten, daß bzgl. des ersten Peaks der Antwortmechanismus beim Foeten schon angelegt ist, die zweite Phase postnatal jedoch erst noch entwickelt werden muß.

Es wird vermutet, daß der erste Peak möglicherweise durch cAMP vermittelt wird, während bei der Ausbildung des zweiten Peaks außer cAMP noch andere Faktoren eine Rolle spielen.
Bei einer in vivo Untersuchung wurde von Kervran und Girard (99) die Dynamik der Insulinsekretion des Foeten in utero nach einer Glucoseinfusion bestimmt. Hierbei ergab sich ebenfalls ein erster Anstieg der foetalen Insulinfreisetzung, danach ein Abfall. Daraufhin war wieder ein leichter, langsamer Anstieg feststellbar. Daraus schließen die Autoren auf einen biphasischen Sekretionsverlauf, wobei nur ein quantitativer Unterschied zwischen Foeten und Erwachsenen bestehen soll.

4.1.2.2. Einfluß von Aminosäuren und Sulfonylharnstoffen

Wie sich durch Untersuchungen mit anderen Stimulantien der Insulinsekretion außer Glucose ergab, besteht im foetalen Stadium keineswegs eine generelle Insulinsekretionsinsuffizienz.
Bei der Inkubation menschlicher Pankreasstücke von Foeten zeigte sich eine Stimulierbarkeit der Insulinfreisetzung in Anwesenheit der Aminosäuren Arginin und Leucin (100). Dies war im Hinblick auf Erwachsene bereits bekannt (70,71). Schäfer et al. (101) fanden ebenfalls bei menschlichen Foeten einen Anstieg der Insulinsekretion unter dem Einfluß von Arginin.

Auch bei der Ratte führen Arginin und Leucin im perinatalen Stadium zu einer gesteigerten Freisetzung von Insulin (72,102,103,104).
Allerdings sind die sezernierten Insulinmengen um ein Vielfaches geringer als bei erwachsenen Tieren.
Sodoyez et al. (105) beschreiben eine neueste Studie, in der Rattenfoeten einen Tag vor der Geburt durch Kaiserschnitt entbunden und in Verbindung mit der Plazenta belassen wurden. Dadurch blieb die Versorgung des Foeten insbesondere auch mit Aminosäuren aus der Plazenta erhalten. Hierbei wurde ebenfalls ein erhöhter Plasmainsulinspiegel beim Foeten festgestellt.
In der Kontrollgruppe, bei der die Nabelschnur durchtrennt wurde, war keine Insulinsekretion nachweisbar.
Die Autoren schließen hieraus, daß aus der Plazenta vermutlich ein Stoff abgegeben wird, der die foetale ß-Zelle zur Insulinsekretion anregt.

Unter dem Einfluß von Sulfonylharnstoffen wie Tolbutamid (72) oder Glibenclamid (106) ist, wie bei den Erwachsenen, eine deutliche Stimulation der Insulinfreisetzung auch bei foetalen und neugeborenen Ratten zu verzeichnen.
In Anwesenheit von 16,7 mM Glucose bewirkt Glibenclamid (1 µg/ml) bei Rattenfoeten in Perifusionsversuchen die Ausbildung einer zweiten Phase der Insulinsekretion, welche unter dem Einfluß von Glucose allein bestenfalls sehr schwach ausgeprägt auftritt.
Die sezernierte Insulinmenge liegt jedoch deutlich unter dem Niveau der Erwachsenen.

4.1.2.3. Das Adenylatcyclasesystem

Eine Beteiligung des Adenylatcyclasesystems an der glucosestimulierten Insulinfreisetzung ist für erwachsene Ratten bereits bekannt (107,108).
Auch bei Inseln foetaler und neugeborener Ratten führt eine Erhöhung der insulären Konzentration von cAMP, sei es durch Stimulation der Adenylatcyclase oder durch Hemmung der Phosphodiesterase, zu einer Sekretion von Insulin.
Während Glucose allein den cAMP-Gehalt in der ß-Zelle der neugeborenen Ratte nach einer Inkubationsdauer von drei Minuten nicht zu erhöhen vermag (109), wurde von Heinze und Steinke (102) ein stimulierender Einfluß des Phosphodiesterasehemmstoffes Theophyllin in Gegenwart von Glucose (16,7 mM) auf die Insulinfreisetzung bei foetalen und neugeborenen Ratten nachgewiesen.
Von Taniguchi et al. (110) wurde dies für neugeborene Ratten bestätigt.
Auch Coffein, welches ebenfalls hemmend auf die Phosphodiesterase wirkt, ruft in Anwesenheit von Glucose bei der foetalen Ratte (27) eine gesteigerte Insulinfreisetzung hervor.
Wie von anderen Autorengruppen mit Hilfe von Perifusionsversuchen an foetalen Pankreasstücken der Ratte festgestellt wurde, ist durch Theophyllin in Gegenwart von Glucose ein biphasisches Insulinsekretionsprofil zu verzeichnen, das ähnlich dem der Erwachsenen ist (111,112).

Daraus läßt sich die Schlußfolgerung ableiten, daß durch die Hemmung der Phosphodiesterase eine Akkumulation von cAMP in der ß-Zelle entsteht, das letztlich den Sekretionsmechanismus für Insulin aktiviert.
Wenngleich Glucose allein den cAMP-Gehalt der ß-Zelle nicht zu erhöhen vermag (109), so liegt wohl doch kein genereller Defekt des Adenylatcyclasesystems im perinatalen Stadium vor, da dies durch andere Stimulantien aktiviert werden kann, wie es auch Untersuchungen bei menschlichen Foeten bestätigen (113,114,115).
Im quantitativen Vergleich der freigesetzten Insulinmenge in Gegenwart der Phosphodiesterasehemmstoffe bei Erwachsenen und Foeten liegen die Foeten jedoch um ein Vielfaches unter dem Niveau der Erwachsenen.

4.2. Bedeutung des Glucosemetabolismus Langerhansscher Inseln für die Insulinsekretion bei Neugeborenen und Foeten

Der Tatsache, daß andere Stimulantien in der Lage sind, die Langerhansschen Inseln der Foeten und Neugeborenen zur Insulinsekretion anzuregen, ist zu entnehmen, daß bei der foetalen ß-Zelle kein generelles Unvermögen zur Insulinsekretion vorliegt, sondern daß die mangelnde Stimulationsfähigkeit der Glucose vermutlich in der Erkennung des Moleküls selbst bzw. in seinem Metabolismus in der ß-Zelle begründet sein muß.

Das Auftreten eines kleinen ersten Peaks bei der Insulinfreisetzung und die mangelnde Ausbildung einer zweiten Phase (97,98) führt zu der Annahme, daß wohl kurzzeitig das Glucosemolekül mit einem Rezeptor reagiert und den ersten Peak bewirkt, jedoch anschließend ein Defekt im Metabolisierungsvorgang der Glucose vorliegen muß und so die zweite Phase ungenügend ausgebildet wird.

4.2.1. Bedeutung des NADH / NAD - Quotienten

Die Reduktiosäquivalente werden zum einen in Form von NADH im Embden-Meyerhof-Abbauweg der Glucose gebildet. Bei der Stimulation der Insulinsekretion mit 16,7 mM Glucose in der Langerhansschen Insel der erwachsenen Ratte ist dosisabhängig ein Anstieg des NADH-Gehaltes zu verzeichnen (116).
Die Messungen der vorliegenden Arbeit ergaben, daß die Zugabe von Glucose ins Inkubationsmedium der Inseln von foetalen und neugeborenen, fünf Tage alten Ratten ebenfalls einen Anstieg des NADH-Gehaltes und des NADH/NAD - Quotienten im gleichen Verhältnis wie bei den erwachsenen Tieren in Abhängigkeit von der eingesetzten Glucosemenge bewirkt.
Daraus kann man die Schlußfolgerung ableiten, daß der Abbauweg der Glucose über die Glykolyse in der Langerhansschen Insel der Foeten bereits funktionsfähig ist.

Die Tatsache, daß trotz der dosisabhängigen Steigerung der NADH-Bildung die Glucose beim Foeten keinen oder nur einen geringfügigen Anstieg der Insulinsekretion hervorruft, unterstützt die Theorie, daß dem NADH / NAD - Quotienten nicht die Hauptbedeutung im Mechanismus der Stimulation der Insulinsekretion durch Glucose zukommt und daß die mangelnde Insulinantwort beim Foeten nicht auf eine Störung in diesem System zurückzuführen ist.

4.2.2. Bedeutung des NADPH / NADP - Quotienten

Watkins et al. (117) fanden, daß in erster Linie die Zugabe von NADPH und weniger von NADH ins Inkubationsmedium von Langerhansschen Inseln des Schwertfisches die Freisetzung von Insulin stimuliert.
Die Reduktionsäquivalente in Form von NADPH werden unter anderem im Abbau der Glucose über den Pentosephosphatshunt bereitgestellt.
Wie bereits in der Einleitung besprochen, steigt bei der Stimulation der Insulinsekretion mit Glucose dosisabhängig die Aktivität des PPS und parallel dazu der NADPH / NADP - Quotient der Langerhansschen Insel der erwachsenen Ratte (31,32, 37,118).
Den neuesten Untersuchungen unseres Arbeitskreises kann man entnehmen (51), daß im Gegensatz dazu im foetalen Stadium bei der Ratte die Aktivität des PPS bei Zugabe erhöhter Glucosemengen nicht gesteigert werden kann,

dies jedoch bei fünf Tage alten neugeborenen Tieren bereits möglich ist.
Die Untersuchung des NADPH- und NADP-Gehaltes sowie des NADPH / NADP - Quotienten der Inseln von Foeten und Neugeborenen in der vorliegenden Arbeit führten zu Ergebnissen, die sich analog dazu verhalten:
Bei den foetalen Ratten war keine Änderung des Gehalts an NADPH und NADP sowie des NADPH / NADP - Quotienten der Langerhansschen Insel unter dem Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen zu verzeichnen.
Dagegen wird in den Inseln der neugeborenen, fünf Tage alten Ratten der Gehalt an NADPH dosisabhängig von der eingesetzten Glucosemenge sehr stark erhöht und entsprechend dazu der NADP - Gehalt erniedrigt.
Dieser Unterschied im Bezug auf die phosphorylierten Pyridinnukleotide bei Foeten und fünf Tage alten Neugeborenen könnte mit der verminderten Sensibilität der foetalen ß-Zelle auf Glucose als Stimulans der Insulinsekretion in ursächlichen Zusammenhang gebracht werden.

4.2.3. Bedeutung des GSH / GSSG - Qotienten

Untersuchungen innerhalb unseres Arbeitskreises bestätigen die Theorie, daß die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten für die Insulinsekretion von Bedeutung ist.
Ammon et al. (119) stellten fest, daß eine Erhöhung der Glucosekonzentration mit einem Anstieg der Insulinfreisetzung und des GSH / GSSG - Quotienten bei erwachsenen Ratten einhergeht.
Darüberhinaus wiesen Ammon und Mitarbeiter nach (120), daß parallel zur Steigerung der Insulinsekretion die Zugabe von Glucose bei erwachsenen Ratten dosisabhängig zu einer erhöhten Aktivität des PPS, zu einem Anstieg des NADPH / NADP - Quotienten und des GSH / GSSG - Quotienten führt. Das zum Teil im Pentosephosphatshunt gebildete NADPH muß also eine vermehrte Bildung von reduziertem Glutathion bewirken.
Mit Hemmstoffen wie Diamid, einem Oxidans von GSH und anderen Thiolen (121) und t-BHP, das als Substrat der Glutathionperoxidase fungiert (122), wurde die durch Glucose induzierte Insulinsekretion gehemmt und der durch Glucose erhöhte GSH-Gehalt der Insel erniedrigt (123), was wiederum eindeutig einen Zusammenhang zwischen GSH-Gehalt und Insulinfreisetzung aufzeigt.
Durch den intrazellulären GSH / GSSG - Quotienten, der seinerseits vom NADPH / NADP - Quotienten abhängig ist,

kann möglicherweise der Redoxzustand membranständiger SH - Gruppen moduliert werden (124).
Dies könnte über eine sterische Änderung der Membranstruktur zu einer veränderten Ionenpermeabilität, z.B. zur Calcium-Aufnahme (125) und über weitere Zwischenstufen zur Insulinsekretion führen.
So kann man vermuten, daß beim Glucosemetabolismus über den PPS über die Bildung von NADPH und GSH die ß-Zelle in einen hohen Redoxstatus versetzt wird und sie dadurch sensitiv auf die Insulin-triggernde Wirkung verschiedener Signale reagiert (126).
Aufgrund dieser Befunde wurde in unserem Arbeitskreis nun der insuläre Gehalt an reduziertem und oxidiertem Glutathion bei foetalen und neugeborenen, fünf Tage alten Ratten gemessen (81). Die Untersuchungen ergaben, daß der GSH / GSSG - Quotient im foetalen Alter bei Erhöhung der Glucosekonzentration von 5,6 mM auf 16,7 mM nicht gesteigert werden kann, während bei den Neugeborenen fünf Tage p.p., wie auch bei den Erwachsenen, die vermehrte Glucosezugabe zu einer signifikanten Zunahme des GSH - Gehaltes, zu einer Abnahme des GSSG - Gehaltes und damit zu einem Anstieg des GSH / GSSG - Quotienten führt.
Die mangelnde Bereitstellung von reduziertem Glutathion könnte die Ansprechbarkeit der ß-Zelle auf einen Glucosereiz im foetalen Stadium herabsetzen.

4.3. Regulation des Redoxzustandes durch Enzyme

Im Abbauweg der Glucose über den Pentosephosphatshunt erfolgt die Bildung der reduzierten phosphorylierten Pyridinnukleotide durch die Katalyse zweier Enzymsysteme, der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase:

$$\text{Glucose-6-phosphat} + \text{NADP}^+ \xrightleftharpoons{\text{Gluc-6-P-DH}} \text{6-Phosphogluconat} + \text{NADPH}$$

$$\text{6-Phosphogluconat} + \text{NADP}^+ \xrightleftharpoons{\text{6-PG-DH}} \text{Ribulose-5phosphat} + \text{NADPH}$$

Der PPS ist im Cytoplasma lokalisiert. Seine Aufgabe ist die Bereitstellung von NADPH im extramitochondrialen Raum als Reduktionsmittel für die Erhaltung des Glutathionsystems in funktionellem reduziertem Zustand (127). Die Übertragung des Wasserstoffs vom NADPH auf das Glutathion erfolgt mit Hilfe der Glutathionreduktase:

$$\text{GSSG} + 2\ \text{NADPH} \xrightleftharpoons{\text{Glutathionreduktase}} 2\ \text{GSH} + 2\ \text{NADP}^+$$

Der geschwindigkeitslimitierende Schritt des PPS ist die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion, wie dies z.B. in der Leber der Ratte nachgewiesen wurde (128). Bei Versuchen mit menschlichen Erythrocyten, die einen Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase - Mangel aufweisen, wurde festgestellt, daß nach einer 6stündigen Inkubation dieser Erythrocyten das NADPH-NADP-Gleichgewicht fast

ganz auf die Seite der oxidierten Form verschoben war, während bei normalen Erythrocyten die reduzierte Form vorherrschte (129).
Dies weist ebenfalls auf die Bedeutung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase für die Bildung von NADPH hin.

Wie von Ammon und Mitarbeitern (45) gezeigt werden konnte, erfolgt die Hemmwirkung des exogenen Insulins auf die Insulinsekretion in Langerhansschen Inseln der Ratte durch Beeinflussung der Aktivität des PPS vermutlich an der Stelle der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase: Unter dem Einfluß von exogenem Insulin fiel der 6-Phosphogluconat-Gehalt der Insel ab, der Glucose-6-phosphat-Gehalt stieg an. Parallel hierzu führte es zu einer erniedrigten Oxidation von Glucose über den PPS und damit zu einem Abfall des NADPH-Gehaltes. Das läßt auf eine verminderte Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in Anwesenheit von exogenem Insulin schließen, was wiederum die Freisetzung von Insulin mindert.

Die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase benötigt spezifisch $NADP^+$ als Elektronenakzeptor. Untersuchungen an Homogenaten von normalen Mäuseinseln von Ashcroft und Randle (130) zeigen, daß der NADPH/NADP-Quotient im Cytosol einen wichtigen Faktor bei der Kontrolle der Reaktion der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase darstellt.

Ein hoher NADPH-Gehalt übt, wie in reaktionskinetischen Messungen nachgewiesen wurde (130), eine kompetitive Hemmwirkung im Bezug auf das $NADP^+$ auf die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus.
Es findet eine isosterische kompetitive Produkthemmung statt, d.h. das Produkt (NADPH) hat eine Strukturähnlichkeit mit dem Substrat ($NADP^+$) und bindet an die Substratbindungsstelle des Enzyms (isosterisch).
Dadurch wird die effektive Halbsättigungskonzentration erhöht und die Enzymaffinität vermindert.
In Gegenwart einer großen Produktmenge werden erhöhte Substratkonzentrationen benötigt, um die gleiche Geschwindigkeit wie in Abwesenheit des Produkts zu erreichen.
Das heißt also, daß die Michaelis-Konstante K_M durch die kompetitive Produkthemmung erhöht wird und folglich die Substratkonzentration, bei der halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird, erhöht ist und die Enzymaktivität erniedrigt ist.
Es müßte in diesem Falle mehr $NADP^+$vorliegen, um einen erhöhten NADPH-Gehalt wieder auszugleichen.
Im normalen Reaktionsablauf in der Langerhansschen Insel kommt es nicht zu einer Akkumulation von NADPH, da dieses mit Hilfe der Glutathionreduktase zur Reduktion von GSSG sofort wieder verbraucht wird.
Die Reduktion von GSSG durch die Glutathionreduktase findet im Cytosol statt, und Untersuchungen an Pankreasinseln zeigen, daß auch der NADPH/NADP-Quotient im Cytosol durch Glucosegabe stärker beeinflußt wird als in den Mitochondrien (131).

Die Aktivität der Glutathionreduktase ist in Inseln vergleichsweise größer als im exokrinen Pankreas oder in der Leber (132).
Als Kofaktor für die Gluthationreduktase ist das NADPH wichtiger als das NADH, denn bei Versuchen mit ob ob - Mäusen wurde festgestellt, daß die Enzymaktivität der Glutathionreduktase mit NADPH als Kofaktor um ein Vielfaches höher ist als die mit NADH (133,134).

Während diese hier beschriebenen Reaktionen in der ß-Zelle der Erwachsenen ungestört ablaufen und die Stimulation mit Glucose in der Langerhansschen Insel somit eine erhöhte Insulinsekretion auslöst, liegt vermutlich im perinatalen Stadium hier an irgendeiner Stelle ein Defekt vor, der eine sehr abgeschwächte Reaktion auf Glucose als Insulinsekretionsstimulans bewirkt.
Stellt man die bereits beschriebenen Messergebnisse bei Foeten und Neugeborenen den Werten der Erwachsenen quantitativ gegenüber, so kann man eindeutig erkennen, daß im foetalen Stadium durch fehlende Stimulierbarkeit der Aktivität des PPS durch Glucose (9) diese weit geringer ist als in Inseln von Erwachsenen (51). Entsprechend dazu konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß auch der NADPH-Gehalt der foetalen ß-Zelle durch erhöhte Glucosemengen im Inkubationsmedium nicht gesteigert werden kann, während dies bereits bei fünf Tage alten Neugeborenen wie bei Erwachsenen möglich ist.

Stellt man jedoch auch hier einen quantitativen Vergleich der NADPH/NADP-Quotienten der Inseln in den verschiedenen Altersstufen an, so liegt dieser erstaunlicherweise bei den Foeten unbeeinflußt von der Glucosemenge gleichbleibend hoch auf dem Niveau des NADPH/NADP-Quotienten von Erwachsenen bei maximaler Glucosestimulation.
Der Anstieg des NADPH/NADP-Quotienten der Neugeborenen fünf Tage p.p. dagegen ist von der Glucosekonzentration abhängig und verläuft parallel zu den Erwachsenen.
Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß bei den Foeten bereits ein maximaler Teil der phosphorylierten Pyridinnukleotide in reduzierter Form vorliegt und daß Glucose diesen Anteil nicht mehr erhöhen kann.

Andererseits ergaben Messungen des GSH/GSSG-Quotienten bei foetalen Ratten (81), daß dieser bei Erhöhung der Glucosemenge nur geringfügig zunimmt und bei 16,7 mM Glucose deutlich unter dem Quotienten Erwachsener und fünf Tage alter Neugeborener liegt.
Wie schon erwähnt, könnt die Unfähigkeit zur Erhöhung des GSH/GSSG-Quotienten eine Ursache für die verminderte Ansprechbarkeit der Insulinsekretion auf einen Glucosereiz hin sein.
Man könnte nun aufgrund dieser Meßergebnisse schließen, daß in der Übertragung der Reduktionsäquivalente vom NADPH auf das GSSG ein Defekt vorliegen muß, d.h. daß die Glutathionreduktase-Aktivität beim Foeten noch nicht voll ausgebildet ist.

Aus diesem Grund könnte es zu einer Akkumulation der phosphorylierten Pyridinnukleotide in der reduzierten Form kommen, während der GSH-Gehalt niedrig bleibt. Die Ursache für eine mögliche verminderte Aktivität der Glutathionreduktase ist noch ungeklärt.
Da die Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase andererseits in erster Linie durch die vermehrt anfallende Menge an NADPH kompetitiv gehemmt wird (130), könnte dies die Ursache sein, daß der hohe Anteil an NADPH in der foetalen ß-Zelle ein negatives feed-back auf die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ausübt und somit wiederum die Aktivität des PPS herabsetzt.

Für diese Hemmwirkung auf die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ist in erster Linie der NADPH/NADP-Quotient im Cytosol der ß-Zelle verantwortlich (130), der, wie in Pankreasinseln nachgewiesen (131), im Cytosol durch Glucosegabe stärker beeinflußt wird als in den Mitochondrien. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch der Gesamtgehalt der Inseln an NADPH bei Foeten, Neugeborenen und Erwachsenen gemessen, sodaß über den quantitativen Gehalt im Cytosol an NADPH beim Foeten keine Aussage getroffen werden kann.

Es ist jedoch ohne weiteres vorstellbar, daß beim Foeten der NADPH/NADP-Quotient im Cytosol in einer Höhe liegt, daß seine kompetitive Hemmwirkung auf die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zum Tragen kommt.

Anhand von Versuchen an der Rattenleber (128) wird von Eggleston und Krebs eine andere Möglichkeit der Enzymhemmung diskutiert. Sie fanden, daß bei physiologischen Konzentrationen von NADPH und NADP in der Leber die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase fast vollständig gehemmt wird. Die Hemmung ist fast 100%, wenn der Quotient den Wert 9 übersteigt. Im Rattenlebercytoplasma beträgt er etwa 100. Das heißt also, die Regulation der Enzymaktivität ist eine Frage der "Enthemmung". Es zeigte sich, daß nur GSSG in physiologischen Konzentrationen der Hemmwirkung des NADPH entgegenstehen kann, wobei allerdings noch ein Kofaktor an der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase beteiligt sein muß, der isoliert werden konnte und sehr instabil ist.

Möglicherweise übt GSSG im Normalfall auch in der Langerhansschen Insel eine Kontrolle auf den PPS aus, indem es die Hemmwirkung des NADPH auf die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aufhebt.

Es wäre nun denkbar, daß diese Situation auch auf das Pankreas im foetalen Alter übertragen werden kann und hier durch Fehlen dieses Kofaktors die Aufhebung der Hemmwirkung des NADPH auf die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase durch GSSG nicht möglich ist.

Somit kommt es trotz hohen Anteils an GSSG in der foetalen ß-Zelle zu einer Hemmwirkung des erhöhten NADPH/NADP-Quotienten auf die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und damit zu einer Erniedrigung der Aktivität des PPS.

Anhand der beschriebenen Befunde kann in jedem Fall vermutet werden, daß aufgrund eines Defektes in der Übertragung der Reduktionsäquivalente, möglicherweise bedingt durch eine verminderte Glutathionreduktase-Aktivität, ein hoher NADPH/NADP-Quotient ein negatives feed-back auf die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase ausübt, dadurch die PPS-Aktivität erniedrigt wird und somit letztendlich die foetale Langerhanssche Insel in ihrer Sensitivität gegenüber Glucose als Insulin-sekretionsstimulans sehr stark herabgesetzt ist.

4.4. Bedeutung des Glucosemetabolismus Langerhansscher Inseln für die Insulinsekretion im Alter

4.4.1. Bedeutung der Reduktionsäquivalente

Wie in der frühen Entwicklungsphase bis um den Zeitpunkt der Geburt eine gewisse Sekretionsinsuffizienz der Langerhansschen Insel anzutreffen ist, so läßt diese Fähigkeit zur Insulinsekretion auf Glucosestimulation ebenso im höheren Alter zum Ende der Lebenszeit hin wieder nach, wie von verschiedenen Autoren an der isolierten Insel nachgewiesen wurde (63,64,65,135).
Es stellt sich nun die Frage, ob die Ursache hierfür in beiden Stadien des Lebens an derselben Stelle zu suchen ist.
Die Autorengruppe um L.G.Lipson (136) sieht eine mögliche Ursache in der erniedrigten Adenylatcyclase-Aktivität, die sie an isolierten Inseln der Ratte im Alter von 15 Monaten bei gleichbleibender Phosphodiesterase- und Proteinkinase-Aktivität nachgewiesen haben.
Sie leiten daraus eine mögliche Bedeutung des Adenylcyclase-cAMP-Systems für die abgeschwächte Insulinantwort der Inseln alter Ratten auf Glucosestimulation ab.
Untersuchungen unseres Arbeitskreises (69) deuten jedoch eher auf einen gestörten Abbau der Glucose über den Pentosephosphatshunt.

Sie stellten fest, daß sich die Aktivität des PPS durch Erhöhung der Glucosekonzentration bei Inseln zwei Jahre alter Ratten im Gegensatz zu den jungen nicht signifikant steigern läßt.
Trotz dieser offensichtlichen Hemmung des PPS im Alter konnte in der vorliegenden Arbeit an Langerhansschen Inseln zwei Jahre alter Ratten keine Verminderung des NADPH-Gehaltes im Vergleich zu jungen Tieren gefunden werden, wie dies bei alten Mäusen schon festgestellt wurde (63).
Bei alten wie bei jungen Tieren steigt der NADPH-Gehalt der Inseln dosisabhängig von der eingesetzten Glucosemenge im selben Umfang an. Parallel dazu ist ein Abfall des NADP-Gehaltes in der Insel zu verzeichnen.
Entsprechend hierzu steigt der NADPH/NADP-Quotient mit steigender Glucosekonzentration in den beiden Altersstufen im selben Maße an.
Auch im quantitativen Vergleich der Gehalte an phosphorylierten Pyridinnukleotiden ist zwischen Alt und Jung kein Unterschied festzustellen.
Die alternde ß-Zelle besitzt folglich noch in vollem Umfang ihre Fähigkeit, Reduktionsäquivalente in Form von NADPH bereitzustellen.
Im Gegensatz dazu ist neueren Ergebnissen unseres Arbeitskreises zu entnehmen (80), daß die Inseln alter Ratten nicht imstande sind, eine Erhöhung der extrazellulären Glucosekonzentration mit einem Anstieg des intrazellulären GSH und GSH/GSSG-Quotienten zu beantworten.

Es ist also der alternden ß-Zelle, wie auch im foetalen Stadium, nicht möglich, einen bestimmten GSH/GSSG - Quotienten aufrechtzuerhalten, wie er vermutlich für die Auslösung des Insulinsekretionsvorganges durch Stimulation mit Glucose Voraussetzung ist.

4.4.2. Einfluß der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der Glutathionreduktase auf den Redox-Zustand der Inseln im Alter

Aufgrund der vorliegenden Befunde ist eine gewisse Parallele zwischen den beiden Altersstufen, vor der Geburt und im hohen Alter, zu ziehen.
Bei beiden ist eine verringerte Aktivität des PPS zu verzeichnen, wohingegen bei erhöhter Glucosegabe der NADPH/NADP-Quotient maximal auf die Seite der reduzierten Form verlagert ist. Ein Anheben des GSH/GSSG-Quotienten ist dagegen unter dem Einfluß von Glucose nicht möglich. Abraham und Mitarbeiter (137) wiesen auf eine Verminderung der Glutathionreduktase-Aktivität in Erythrocyten von 37 Monate alten Mäusen hin.
Falls es in den Langerhansschen Inseln alter Ratten zu einem ähnlichen Aktivitätsverlust käme, könnte dies die Erklärung für den im Alter trotz ausreichend zur Verfügung stehenden NADPHs fehlenden Anstieg des GSH beim Übergang von 5,6 mM auf 16,7 mM Glucose liefern. Auch in anderen Geweben, wie Leber, Niere und Herz von alten Mäusen ist ein Abfall des reduzierten Glutathiongehaltes nachzuweisen (138).

Dieser wird von den Autoren als ein Charakteristikum aller alternden Gewebe angesehen und die Ursache ebenfalls in einem Abfallen der Glutathionreduktase-Aktivität gesucht.
Dieser Defekt wiederum könnte in den Langerhansschen Inseln der alternden Ratte einen Rückstau der Reduktionsäquivalente an der Stelle des NADPH bewirken.
Aufgrund der Tatsache, daß die Konzentration des NADPH einen kompetitiven Antagonismus gegenüber dem $NADP^+$ im Bezug auf die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in der ß-Zelle ausübt (130), könnte der erhöhte NADPH/NADP - Quotient ein negatives feed-back auf die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bewirken.
Da diese als Schrittmacherenzym des PPS fungiert, wäre hierin eine Erklärung für die durch Glucosegabe nicht mehr steigerbare Aktivität des PPS bei alten Ratten zu suchen.
Auch von anderen Autoren wird diese Annahme bestärkt.
Leathem et al. (139) fanden bei 18 Monate alten Ratten eine signifikant herabgesetzte Aktivität der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase in Ovarien.
Aufgrund dieser Ergebnisse liegt die Annahme nahe, daß die Erniedrigung der Aktivitäten der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und der Glutathionreduktase auch im Alter zu einer mangelnden Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten in der ß-Zelle führt, die wiederum für die verminderte Reaktion der Insel auf einen Glucosereiz mit einer entsprechenden Insulinsekretion verantwortlich gemacht werden kann. Hierin ist eindeutig eine Analogie zu der Situation beim Foeten zu sehen.

4.4.3. Einfluß von Leucin auf die Pyridinnukleotide im Alter

Die Aminosäure Leucin bewirkt bei alten Ratten nachweislich keine so effiziente Steigerung der Insulinfreisetzung wie bei jungen Tieren (135).
Wie Ergebnisse unseres Arbeitskreises zeigen (69), hängt die insulinotrope Wirkung von Leucin weder bei jungen noch bei alten Tieren mit einer Steigerung der PPS-Aktivität in der Langerhansschen Insel zusammen, sodaß der im Alter ausbleibende Anstieg des PPS zumindest bei Stimulation mit Leucin nicht als Ursache für die altersabhängige Herabsetzung der Insulinsekretion in Frage kommt.
Dem NADPH/NADP-System scheint eine Bedeutung bei der leucininduzierten Insulinsekretion zuzukommen, denn Leucin bewirkt in Gegenwart von 11,2 mM Glucose einen Anstieg des NADPH/NADP-Quotienten im Vergleich zu den Kontrollwerten mit Glucose allein (42).
In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls festgestellt, daß in Anwesenheit von 5,6 mM Glucose die Zugabe von 10 mM Leucin einen signifikanten Anstieg des Gehaltes an NADPH und entsprechend einen Abfall des NADP in den Inseln junger Ratten hervorruft.
Die Messungen unter identischen Bedingungen bei zwei Jahre alten Ratten ergaben, daß der NADPH/NADP-Quotient im selben Ausmaß wie bei den jungen Tieren durch den Zusatz von Leucin zur substimulatorischen Glucosekonzentration von 5,6 mM erhöht werden kann.
Die Herkunft des nach Leucin in vermehrtem Umfang anfallenden NADPHs bei Alt und Jung ist noch ungeklärt.

Im Gegensatz dazu ist bezüglich des intrazellulären GSH zwischen jungen und alten Ratten ein Unterschied zu finden.
Während der insuläre GSH-Gehalt bei jungen Ratten durch Leucin in Gegenwart von 5,6 mM Glucose erhöht wird (140), bleibt der GSH/GSSG-Quotient in der Langerhansschen Insel der alten Ratten von der Leucinzugabe unbeeiflußt (80).
Diese Befunde sprechen für die Vermutung, daß der insulinfreisetzende Effekt des Leucins bei jungen Tieren zumindest teilweise mit der GSH-Bildung in Zusammenahng steht, indem es über NADPH reduziertes Glutathion liefert und daß diese Übertragung der Reduktionsäquivalente von NADPH auf das GSSG im höheren Alter nicht mehr voll funktionsfähig ist.
Dies könnte zur Folge haben, daß im Alter der Reiz des Leucins zur Insulinfreisetzung nicht in genügendem Ausmaß und nicht schnell genug beantwortet wird.

5. Zusammenfassung

5.1. Fragestellung

Die Langerhansschen Inseln foetaler Ratten zeigen im Gegensatz zu fünf Tage alten neugeborenen Ratten bei Stimulation mit Glucose und anderen Stimulantien nur eine sehr geringe Ansprechbarkeit der Insulinsekretion. Wie bei erwachsenen Ratten bereits nachgewiesen wurde, kommt dem Stoffwechselweg der Glucose über den PPS eine Bedeutung für die Insulinsekretion zu.
Seine Hauptaufgabe besteht in der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH. Diese wiederum dienen in einer Folgereaktion zur Bildung von reduziertem Glutathion, welches die Ansprechbarkeit der ß-Zelle auf einen Glucosereiz durch Reduktion membranständiger SH-Gruppen erhöht.
Bei Foeten wurde bereits eine erniedrigte Aktivität des PPS festgestellt.
Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob:
1. die Inseln foetaler Ratten bei Stimulation mit verschiedenen Glucosemengen im Vergleich mit fünf Tage alten neugeborenen und erwachsenen Ratten eine Steigerung der Insulinsekretion aufweisen.
2. der Gehalt der Langerhansschen Inseln an NADH und NAD dosisabhängig von der Glucosekonzentration bei Foeten, fünf Tage alten Neugeborenen und Erwachsenen beeinflußt werden kann.

3. der Redoxzustand des NADPH/NADP-Quotienten in den Inseln foetaler, neugeborener fünf Tage p.p. und erwachsener Ratten unter dem Einfluß verschiedener Glucosemengen eine Änderung erfährt.

Auch im Alter ist bei isolierten Langerhansschen Inseln die Stimulierbarkeit der Insulinsekretion unter anderem durch Glucose und durch Leucin herabgesetzt. Ebenso findet sich bei alten Ratten eine erniedrigte Aktivität des PPS.
In der vorliegenden Arbeit sollte weiterhin untersucht werden, ob:
4. der NADPH/NADP-Quotient in Inseln von drei Monate alten im Vergleich zu zwei Jahre alten Ratten in Abhängigkeit von der eingesetzten Glucosemenge erhöht werden kann.
5. Leucin in Gegenwart von substimulatorischer Glucosemenge einen Einfluß auf den Gehalt an NADPH und NADP in Inseln zweijähriger und drei Monate alter Ratten ausübt.

5.2. Ergebnisse

1. Die Insulinsekretion wird bei erwachsenen und neugeborenen, fünf Tage alten Ratten dosisabhängig von der Glucosekonzentration signifikant gesteigert. Die sezernierte Insulinmenge der Neugeborenen erreicht nicht ganz die Werte der Erwachsenen, was sicherlich auf die Größenunterschiede der Inseln zurückzuführen ist.

Dagegen ist bei Foeten 21 Tage p.c. keinerlei Anstieg der Insulinsekretion bei vermehrter Glucosezugabe zu verzeichnen.

2. Die Messung des NADH-Gehaltes der Inseln ergab, daß dieser in allen drei Entwicklungsstufen, bei Foeten, Neugeborenen und Erwachsenen, in Korrelation mit der eingesetzten Glucosemenge erhöht wird, während der NAD-Gehalt keine signifikante Änderung zeigt. Entsprechend dazu verläuft der Anstieg des NADH/NAD - Quotienten in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration in den drei Altersgruppen parallel.

3. Im Gegensatz dazu sind im Redoxzustand des NADPH/NADP-Quotienten Unterschiede zwischen den drei Altersstufen festzustellen.

In Abhängigkeit von der Glucosekonzentration zeigen die Langerhansschen Inseln fünf Tage alter Neugeborener und Erwachsener praktisch eine identische Reaktion auf das Stimulans: einen Anstieg des NADPH-Gehaltes und einen Abfall des NADP-Gehaltes der Insel.

Der insuläre NADPH- und NADP- Gehalt der Foeten dagegen bleibt, unbeeinflußt von der Glucosemenge im Inkubationsmedium, gleichbleibend niedrig.

Der NADPH/NADP - Quotient zeigt demzufolge bei Erwachsenen und Neugeborenen entsprechend der Glucosekonzentration eine Steigerung, bei den Foeten hingegen liegt das Verhältnis von NADPH zu NADP unverändert auf einer Höhe, die die beiden anderen Altersstufen nur in Anwesenheit von 16,7 mM Glucose aufweisen.

4. Bei drei Monate alten und zwei Jahre alten Ratten ist kein Unterschied im Einfluß von verschiedenen Glucosemengen auf den Redoxstatus der phosphorylierten Pyridinnukleotide in der Langerhansschen Insel zu finden. Beide Altersgruppen weisen einen Anstieg des NADPH-, einen Abfall des NADP-Gehaltes und folglich eine Steigerung des NADPH/NADP-Quotienten dosisabhängig zur Glucosekonzentration auf.
5. Auch die Inkubation mit Leucin 10 mM in Gegenwart von Glucose 5,6 mM ruft bei Inseln zwei Jahre alter Ratten dieselbe Reaktion wie bei den drei Monate alten Tieren hervor, nämlich eine Erhöhung des NADPH-Gehalts der Inseln, einen Abfall des NADP-Gehalts und dementsprechend einen Anstieg des NADPH/NADP-Quotienten im Vergleich zur Inkubation mit 5,6 mM Glucose allein.

5.3. Schlußfolgerungen

Die vorliegenden Befunde bestätigen Ergebnisse anderer Autoren, daß foetale Ratten 21 Tage p.c. im Gegensatz zu neugeborenen fünf Tage p.p. und erwachsenen bei Glucosestimulation zu keiner gesteigerten Insulinsekretion fähig sind.
Dies ist vermutlich nicht auf einen Defekt des Glucoseabbaus über die Glykolyse zurückzuführen, da die Bildung von NADH, welche in erster Linie in der Glykolyse erfolgt, beim Foeten ebenso wie bei Neugeborenen fünf Tage nach der Geburt und bei Erwachsenen unter Glucoseeinfluß vermehrt stattfindet.

Dagegen erfährt der NADPH/NADP-Quotient beim Foeten bei erhöhter Glucosezugabe keine Steigerung mehr, sondern liegt schon in maximal reduzierter Form vor. Andere Untersuchungen ergaben, daß der GSH/GSSG-Quotient beim Foeten im Vergleich zu Erwachsenen und Neugeborenen bei Stimulation mit Glucose nicht steigerbar ist. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß beim Foeten ein Defekt in der Übertragung der Reduktionsäquivalente von NADPH auf das GSSG vorliegt, vermutlich aufgrund einer verminderten Aktivität der Glutathionreduktase. Der hohe Anteil an NADPH wiederum übt möglicherweise ein negatives feed-back auf die Enzyme des PPS, vor allem auf die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus, was dessen erniedrigte Aktivität erklären könnte.
Parallel hierzu findet man auch im Alter einen verminderten PPS, einen erniedrigten GSH/GSSG-Quotienten bei hohem Redoxstatus des NADPH/NADP-Quotienten in Gegenwart stimulatorischer Glucosemengen.
Diese Tatsachen könnten, ebenso wie beim Foeten, auf herabgesetzte Aktivitäten der Glutathionreduktase und der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zurückzuführen sein. So bedingt vermutlich letztlich ein Defekt in der Übertragung der Reduktionsäquivalente bei Foeten und bei Alten eine verminderte Ansprechbarkeit der ß-Zelle auf einen Glucosereiz.

6. Literaturverzeichnis

(1) Thorell J.I.
Plasma insulin levels in normal human fetuses
Acta Endocr. (Copenhavn) 63, 134 - 140 (1970)

(2) Mintz D.H., Chez R.A., Horger E.O.
Fetal insulin and growth hormone metabolism in the subhuman primate.
J. Clin. Invest. 48, 176 (1969)

(3) Willes R.F., Boda J.M., Manns J.G.
Insulin secretion by the bovine fetus in utero
Endocrinology 84, 520 (1969)

(4) Espinosa de los Monteros A., Driscoll S.G., Steinke J.
Insulin release from isolated human fetal pancreatic islets.
Science 168, 1111 - 1112 (1970)

(5) Asplund K., Westmann S., Hellerström C.
Glucose stimulation of insulin secretion from the isolated pancreas of fetal and newborn rats.
Diabetologia 5, 260 - 262 (1969)

(6) Milner R.D.G.
The secretion of insulin from fetal and postnatal rabbit pancreas in vitro in response to various substances
J. Endocrin. 44, 267 (1969)

(7) Riet Correa P., Marques M., Kraemer A.
Insulin release by fetal calf pancreas in vitro: Influence of glucose or carbutamide
Amer. J. Physiol. 212, 1402 - 1404 (1967)

(8) Asplund K.
The effect of glucose on the insulin secretion in fetal and newborn rats.
In: "The structure and metabolism of the pancreatic islets" pp. 477 - 484
Eds. Falkmer S., Hellmann B., Täljedal I.B.
Oxford and New York, Pergamon Press (1970)

(9) Heinze E., Steinke J.
Glucose metabolism of isolated pancreatic islets: Difference between fetal, newborn and adult rats.
Endocrinology 88, 1259 - 1263 (1971)

(10) Sodoyez-Goffaux F., Sodoyez J.C., De Vos Cl.J., Foa P.P.
Insulin and glucagon secretion by islets isolated from fetal and newborn rats.
Diabetologia 16, 121 - 123 (1979)

(11) Sodoyez-Goffaux F., Sodoyez J.C., De Vos Cl.J.
Insulin secretion and metabolism during the perinatal period in the rat.
J. Clin. Invest. 63, 1095 - 1102 (1979)

(12) Hellerström C.A., Agren A., Andersson A.
Effects of D-Glceraldehyde and D-Glucose on the insulin release of pancreatic islets isolated from the newborn rat.
Febs Letters 71, 185 - 188 (1976)

(13) Matschinsky F.M., Landgraf R., Ellermann J. Kotler-Brajtburg J.
Glucoreceptor mechanism in islets of Langerhans.
Diabetes 21, 555 - 569 (1972)

(14) Matschinsky F.M., Ellermann J.E.
Dissociation of the insulin releasing and the metabolic functions of hexoses in islets of Langerhans.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 193 - 198 (1973)

(15) Rossini A.A., Soeldner J.S.
Insulin release is anomeric specific in the human.
J. Clin. Invest. 57, 1083 - 1088 (1976)

(16) Ashcroft S.J.H., Hedeskov C.J., Randle P.J.
Glucose metabolism in mouse pancreatic islets
Biochem. J. 118, 143 - 154 (1970)

(17) Ashcroft S.J.H., Weerasinghe L.C.C., Bassett J.M., Randle P.J.
The pentose phosphate cyclus and insulin release in mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 126, 525 - 532 (1972)

(18) Brolin S.E., Berne C., Linde B.
Measurement of the enzymatic activities required for ATP formation by glycolysis in the pancreatic islets of hyperglycemic mice.
Diabetes 16, 21 - 25 (1967)

(19) Lazarow A., Dixit P.K., Lindall A., Moran J., Hostetler K., Cooperstein S.J.
Enzyme specialisation in islet tissue.
In: Brolin S.E., Hellmann B., Knutson H. (eds)
The structure and metabolism of the pancreatic islet
Pergamon Press, Oxford pp. 249 - 268 (1964)

(20) Ashcroft S.J.H., Bassett J.M., Randle P.J.
Insulin secretion mechanisms and glucose metabolism in isolated islets.
Diabetes 21, 538 - 545 (1972)

(21) Coll-Garcia E., Gill J.R.
Insulin release by isolated pancreatic islets of the mouse incubated in vitro.
Diabetologia 5, 61 - 66 (1969)

(22) Howell S.L., Young D.A., Lacy P.E.
Isolation and properties of secretory granules from rat islets of Langerhans.
J. Cell. Biolog. 41, 167 (1969)

(23) Kilo C., Devrim S., Bailey R., Recant L.
Studies in vivo and in vitro of glucose-stimulated release of insulin. The effects of metabolizable sugars, tolbutamide and 2-desoxyglucose.
Diabetes 16, 377 (1967)

(24) Webb J.L.
Enzyme and metabolic inhibitors. Vol. III
Academic. Press, New York p. 61 (1966)

(25) Renold A.E.
Insulin biosynthesis and secretion. A still unsettled topic.
New Engl. J. Med. 282, 173 (1970)

(26) Georg R.H., Sussmann K.E., Kirsch W.L.
Modification of glucose- and tolbutamide-induced insulin release by iodoacetate and antimycin A.
Fed. Proc. Intersoc. 249, 316 - 321 (1971)

(27) Kanazawa Y., Orci L., Lambert A.E.
Organ culture of fetal rat pancreas.
IV. Effects of metabolic inhibitors on insulin release.
Endocrinology 89, 576 - 583 (1971)

(28) Pigman W.
The carbohydrates Bd. I und II
Academic Press, New York (1970/1971)

(29) Ammon H.P.T., Steinke J.
6-Aminonicotinamide (6-AN) as a diabetogenic agent. In vitro and in vivo studies in rats.
Diabetes 21, 143 - 148 (1972)

(30) Ammon H.P.T., Steinke J.
Effect of 6-Aminonicotinamide on insulin release and ^{14}C-glucose oxidation by isolated pancreatic rat islets: Difference between glucose, tolbutamide and aminophylline.
Endocrinology 91, 33 - 38 (1972)

(31) Ammon H.P.T., Verspohl E., Händel M.
Pentose phosphate shunt activity of pancreatic islets depends on glucose concentration.
Diabetologia 13, 377 Abstract (1977)

(32) Verspohl E., Händel M., Ammon H.P.T.
Pentose phosphate shunt activity of rat pancreatic islets: Its dependence on glucose concentration.
Endocrinology 105, 1269 - 1274 (1979)

(33) Ammon H.P.T., Orci L., Steinke J.
Effect of chlorpromazine (CPZ) on insulin release in vivo and in vitro in the rat.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 423 - 429 (1973)

(34) Montague W., Taylor K.W.
The role of pentose phosphate pathway in insulin secretion.
In: The structure and metabolism of pancreatic islets. eds: Falkmer S., Hellmann B., Täljedal I.B.
Pergamon Press, Oxford, pp. 263 - 274 (1970)

(35) Ammon H.P.T., Verspohl E.
Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Endocrinology 99, 1469 - 1476 (1976)

(36) Panten U., Christians J., Kriegstein E., Poser W., Hasselblatt A.
Studies of the mechanism of L-Leucine and α-KIC induced insulin release from perifused isolated pancreatic islets.
Diabetologia 10, 149 - 154 (1974)

(37) Ammon H.P.T., Wagner-Teschner D., Grimm A., Niklas H.
Relationship between NADPH, Glutathione and Glucose-induced insulin secretion in pancreatic rat islets.
Venezia Joint Meeting of German and Italian Pharmacologists, Abstract p. 314 (1977)

(38) Wagner-Teschner D.
Einfluß der Glucosekonzentration auf den NADP- und NADPH-Gehalt sowie die glucose-induzierte Insulinsekretion Langerhansscher Inseln von gefütterten und hungernden Ratten.
Diplomarbeit Fachbereich Chemie-Biochemie Tübingen (1977)

(39) Ammon H.P.T.
Effect of glucose and methylene blue on NADP, NADPH and insulin secretion of isolated pancreatic rat islets.
Arch. Pharmakolog. 272 Suppl. R1 (Abstract) (1973)

(40) Ammon H.P.T., Patel T.N., Steinke J.
The role of pentose phosphate shunt in glucose-induced insulin release: In vitro studies with 6-Aminonicotinamide, methyleneblue, NAD, NADH, NADP, NADPH and nicotinamide on isolated pancreatic islets.
Biochim. Biophys. Acta 297, 352 - 367 (1973)

(41) Hoppe E.
Einfluß von Leucin und Arginin auf die Sekretion von Insulin sowie den NADPH/NADP-Quotienten und den NADH/NAD-Quotienten Langerhansscher Inseln
Dissertation Tübingen (1978)

(42) Ammon H.P.T., Hoppe E., Akhtar M.S., Niklas H.
Effect of Leucine on the pyridine nucleotide contents of islets and on the insulin released – interactions in vitro with methylene blue, thiol oxidants and p-chlormercuribenzoate.
Diabetes 28, 593 - 599 (1979)

(43) Ammon H.P.T., Akhtar M.S., Niklas H., Hegner D.
Inhibition of p-chlormercuribenzoate- and glucose-induced insulin release in vitro by methylene blue, diamide and tert-butyl-hydroperoxide.
Molec. Pharmacology 13, 598 - 605 (1977)

(44) Ammon H.P.T.,
Effects of insulin on pyridinnucleotides in pancreatic islets.
Nauyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. Suppl. 282,2(1974)

(45) Akhtar M.S., Verspohl E., Hegner D., Ammon H.P.T.
6-Phosphogluconate/glucose-6-phosphate ratio in rat pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Diabetes 26, 857 - 863 (1977)

(46) Zawalich W.S., Dye E.S., Matschinsky F.M.
Nicotinamide modulation of rat pancreatic islet cell responsiveness in vitro.
Horm. Metab. Res. 11, 469 - 471 (1979)

(47) Matschinsky F.M., Kauffman F.C., Ellerman J.E.
Effects of hyperglycaemica on the hexose monophosphate shunt in islets of Langerhans
Diabetes 17, 475 - 480 (1968)

(48) Field J.B., Johnson P., Herring B., Weinberg A.N.
Evidence for hexose-monophosphate pathway for glucose metabolism in human pancreatic ß-cells.
Nature 185, 468 - 469 (1960)

(49) Ammon H.P.T., Verspohl E.
Effect of methylene blue on pyridine nucleotides and insulin secretion of rat pancreatic islets.
Diabetologia 17, 41 - 44 (1979)

(50) Katz J., Wood H.G.
The use of $^{14}CO_2$ yields from glucose-1-^{14}C and -6-^{14}C for the evalution of the pathways of glucose metabolism
J. Biol. Chem. 238, 517 - 524 (1963)

(51) Düppenbecker H.
Einfluß der Glucosekonzentration auf die Glucose-utilisation, die Glucoseoxidation sowie die Pentose-phosphatshunt-Aktivität bei Langerhansschen Inseln von foetalen, neugeborenen und trächtigen Ratten.
Dissertation (1981)

(52) Sandberg H., Yoshimine N., Maeda S., Symons D., Zavodnick J.
Effects of an oral glucose load on serum immunoreactive insulin, free fatty acid, growth hormone and blood sugar levels in young and elderly subjects.
J. of the Amer. Geriatr. Soc. 21, 433 - 439 (1973)

(53) Dudl J., Ensinck J.
Insulin and glucagon relationships during aging in man.
Metabolism 26, 33 - 41 (1977)

(54) Fedele D., Valerio A., Molinari M., Crepaldi G.
Glucose tolerance, insulin and glucagon secretion in aging.
Diabetologia 13, 392 (Abstract 84) (1977)

(55) Sinha M.K., Mondal A.N., Rastogi G.K.
Influence of age on glucose tolerance in normal subjects.
Acta diabet. lat. 11, 78 (1974)

(56) Hajdu A., Herr F., Rona G.
The functional significance of a spontaneous pancreatic islet change in aged rats.
Diabetologia 4, 44 - 47 (1968)

(57) Bracho-Romero E., Reaven G.M.
Effect of age and weight on plasma glucose and insulin response in the rat.
J. of the Amer. Geriatr. Soc. Vol. XXV, Nr.7, 299-302 (1977

(58) Gold G., Karoly K., Freeman C., Adelman R.C.
A possible role for insulin in the altered capability for hepatic enzyme adaption during aging.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 1003 - 1010 (1976)

(59) Woldow A., Shapiro B., Cohen J., Kollman G.
Relationship of lipids to glucose tolerance and insulin response in the aged.
J. of the Amer. Geriatr. Soc. 20, 515 - 520 (1972)

(60) Yoshino G., Kazumi T., Kobayashi N., Terashi K., Morita S., Baba S.
Insulin and glucagon relationships during aging in rats.
Endocrinol. Japon. 26, 325 - 329 (1979)

(61) Barbagallo-Sangiorgi G., Laudicina F., Bompiani G.D., Durante F.
The pancreatic beta-cell, response to intravenous administration of glucose in elderly subjects.
J. of the Amer. Geriatr. Soc. 18, 529 - 538 (1970)

(62) Zeytinoglu I.Y., Gherondache C.N., Pincus G.
The process of aging: Serum glucose and immunoreactive insulin levels during the oral glucose tolerance test.
J. of the Amer. Geriatr. Soc. 17, 1 - 14 (1969)

(63) Ammon H.P.T.
Der Einfluß des Alters auf Glucoseoxidation und Pyridinnukleotide der Langerhansschen Insel.
Akt. geront. 4, 755 - 757 (1974)

(64) Coddling J.A., Kalnins A., Haist R.E.
Effects of age and fasting on the responsiveness of the insulin-secreting mechanism of the islets of Langerhans to glucose.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 53, 716 - 725 (1975)

(65) Reaven E.P., Gold G., Reaven G.M.
Effect of age on glucose-stimulated insulin release by the ß-cell of the rat.
J. Clin. Invest. 64, 591 - 599 (1979)

(66) Reaven G.M., Reaven P.D.
Effect of age on glucose oxidation by isolated rat islets.
Diabetologia 18, 69 - 71 (1980)

(67) Olefsky J.M.
The effects of spontaneous obesity on insulin binding, glucose transport and glucose oxidation of isolated rat adipocytes.
J. Clin. Invest. 57, 842 - 851 (1976)

(68) Olefsky J.M.
Mechanisms of decreased insulin responsiveness of large adipocytes.
Endocrinology 100, 1169 - 1177 (1977)

(69) Amm U.
Einfluß von Alter, Leucin und α-Ketoisocapronat auf Glucoseoxidation und Pentosephosphatshunt-Aktivität Langerhansscher Inseln der Ratte.
Dissertation (1981)

(70) Fajans S.S., Floyd J.C., Knopf R.F., Pek S., Weissman P., Conn J.W.
Amino acids and insulin release in vivo.
Israel J. Med. Sci. 8, 233 - 243 (1972)

(71) Floyd J.C., Fajans S.S., Conn J.W., Knopf R.F., Rull J.
Stimulation of insulin secretion by amino acids.
J. Clin. Invest. 45, 1487 - 1502 (1966)

(72) Lambert A.E., Jenrenaud B., Junod A., Renold A.E.
Organ culture of fetal rat pancreas.
II Insulin release induced by amino and organic acids, by hormonal peptides, by cationic alterations of the medium and by other agents.
Biochim. Biophys. Acta 174, 540 - 553 (1969)

(73) Milner R.D.G.
The mechanism by which Leucine and Arginine stimulate insulin release in vitro.
Biochim. Biophys. Acta 192, 151 - 154 (1969)

(74) Basabe J.C., Lopez N.L., Viktora J.K., Wolff F.W.
Insulin secretion studied in the perfused rat pancreas.
I Effect of tolbutamide, leucine and arginine; their interaction with diazoxide, and relation to glucose.
Diabetes 20, 449 - 456 (1971)

(75) Malaisse W.J., Malaisse-Lagae F.
Stimulation of insulin secretion by noncarbohydrate metabolites.
J.Lab. and Clin. Med. 72, 438 - 448 (1968)

(76) Levin S.R., Grodsky G.M., Hagura R., Smith D.F., Forsham P.H
Relationship between arginine and glucose in the induction of insulin secretion from the isolated perfused rat pancreas.
Endocrinology 90, 624 - 631 (1972)

(77) Hellmann B., Sehlin J., Täljedal I.B.
Effects of glucose and other modifiers of insulin release on the oxidative metabolism of amino acids in micro-dissected pancreatic islets.
Biochem. J. 123, 513 - 521 (1971)

(78) Panten U., Kriegstein E., Poser W., Schönborn J., Hasselblatt A.
Effects of L-Leucine and α-Ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets.
Febs Letters 20, 225 - 228 (1972)

(79) Gylfe E., Sehlin J.
Interactions between the metabolism of L-Leucine and D-Glucose in the pancreatic ß-cells.
Horm. Metab. Res. 8, 7 - 11 (1976)

(80) Eujen R.
Zur Rolle des reduzierten Glutathions Langerhansscher Inseln der Ratte bei der Sekretion von Insulin.
Dissertation Tübingen (1979)

(81) Lutz S.
Untersuchungen zum Redoxstatus des Glutathionsystems in der Langerhansschen Insel der Ratte.
Einfluß von Perinatalzeit, exogenem Insulin und Leucin.
Dissertation Tübingen (1981)

(82) Persönliche Information der Firma Thomae, Biberach

(83) Hagemann E.
Ratte und Maus, Versuchstiere in der Forschung
W. de Gruyter Verlag, Berlin

(84) Heinze E., Schatz H., Nierle C., Pfeiffer E.F.
Insulin biosynthesis in isolated pancreatic islets of foetal and newborn rats.
Diabetes 24, 373 - 377 (1975)

(85) Umbreit W.W., Burris R.H., Stauffer J.P.
Manometric and biochemical techniques.
5th Edition, Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minnesota USA, p 146 (1972)

(86) Passoneau J.V., Lowry O.H.
Messungen durch enzymatic cycling
in: Methoden der enzymatischen Analyse.
Bergmeyer, 3. Aufl. II, 2108 - 2122 (1974)
Verlag Chemie, Weinheim

(87) Lacy P.E., Kostianovsky M.
Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16, 35 - 39 (1967)

(88) Asplund K., Hellerström C.
Glucose metabolism of pancreatic islets isolated from neonatal rats.
Horm. Metab. Res. 4, 159 - 163 (1972)

(89) Heding L.G.
Determination of free and antibody-bound insulin in insulin treated diabetic patients.
Horm. Metab. Res. 1, 145 - 146 (1969)

(90) Söldner J.S., Slone D.
Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technique.
Diabetes 14, 771 - 779 (1965)

(91) Händel M.
Pentosephosphatshunt Langerhansscher Inseln und Insulinsekretion
Dissertation Tübingen (1978)

(92) Clark W.R., Rutter W.J.
Synthesis and accumulation of insulin in the fetal rat pancreas.
Dev. Biol. 29, 468 - 481 (1972)

(93) Clark J.L., Steiner D.F.
Insulin biosynthesis in the rat: Demonstration of two proinsulins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 278 (1969)

(94) Asplund K., Andersson A., Jarousse C., Hellerström C.
Symposium II: Fetomaternal unit in diabetes. Clinical and experimental aspects: Function of the fetal endocrine pancreas.
Israel J. Med. Sci. 11, 581 - 590 (1975)

(95) Freie H.M.P., Pasma A., Bouman P.R.
Quantitative analysis of pancreatic islet development and insulin storage in the foetal and newborn rat.
Act. Endocrinolog. 80, 657 - 666 (1975)

(96) Asplund K.
Effects of glucose on insulin biosynthesis in foetal and newborn rats.
Horm. Metab. Res. 5, 410 - 415 (1973)

(97) Asplund K.
Dynamics of insulin release from the foetal and neonatal rat pancreas.
Europ. J. Clin. Invest. 3, 338 - 344 (1973)

(98) Hellerström C., Andersson A., Gunarsson R., Berne C., Asplund K.
Cytophysiology and metabolism of pancreatic B-Cell.
Endocrinologica Experimentalis 8, 115 - 126 (1974)

(99) Kervran A., Girard J.R.
Time course of a glucose-induced increase in plasma insulin in the rat foetus in utero.
J. Endocr. 70, 519 - 520 (1976)

(100) Milner R.D.G., Ashworth M.A., Barson A.J.
Insulin release from human fetal pancreas in response to glucose, leucine and arginine.
J. Endocr. 52, 497 - 505 (1972)

(101) Schäfer L.D., Wilder M.L., Williams R.H.
Secretion and content of insulin and glucagon in human fetal pancreas slices in vitro.
P.S.E.B.M. 143, 314 - 319 (1973)

(102) Heinze E., Steinke J.
Insulin secretion during development: response of isolated pancreatic islets of fetal, newborn and adult rats to theophylline and arginine.
Horm. Metab. Research 4, 234 - 236 (1972)

(103) Marliss E.B., Wollheim C.B., Blondel B., Orci L., Lambert A.E., Stauffacher W., Like A.A., Renold A.E.
Insulin and glucagon release from monolayer cell cultures of pancreas from newborn rats.
Europ. J. Clin. Invest. 3, 16 - 26 (1973)

(104) Jarousse Cl., Rosselin G.
Regulation by glucose and cyclic nucleotides of the glucagon and insulin release induced by amino acids.
Diabete et Metabolisme 1, 135 - 142 (1975)

(105) Sodoyez-Goffaux F., Sodoyez J., De Vos. C.
Evidence for a placento-insular axis in the rat fetus.
Diabetologia 20, 563 - 567 (1981)

(106) Heinze E., Beischer W. Osorio J. Pfeiffer E.F.
Insulin secretion in the perinatal period of the rat, in vivo and in vitro effects of glucose and glibenclamide.
Diabetologia 11, 313 - 320 (1975)

(107) Grill V.
Cyclic AMP and insulin release.
Acta Paediatr. Scand. (Suppl.) 270, 41 - 47 (1977)

(108) Montague W., Howell S.L.
Cyclic AMP and the physiology of the islets of Langerhans.
Adv. Cycl. Nucl. Res. 6, 201 - 243 (1975)

(109) Grill V., Asplund K., Hellerström C., Cerasi E.
Decreased cyclic AMP and insulin response to glucose in isolated islets of neonatal rats.
Diabetes 24, 746 - 752 (1975)

(110) Taniguchi H., Hasegawa M., Kobayashi T., Watanabe Y., Seki M., Murakami K., Baba S.
Restoration by adenosine and theophylline of glucose-induced insulin responsiveness in newborn rats.
Horm. Metab. Res. 9, 257 - 260 (1977)

(111) Burr J.M., Kanazawa Y., Marliss E.B., Lambert A.E.
Biphasic insulin release from perifused cultured fetal rat pancreas. Effects of glucose, pyruvate and theophylline.
Diabetes 20, 592 - 597 (1971)

(112) Kervran A., Randon J.
Development of insulin release by fetal rat pancreas in vitro. Effects of glucose, amino acids and theophylline.
Diabetes 29, 673 - 678 (1980)

(113) Milner R. D.G., Ashworth M.A., Barson A.J.
Insulin release from human foetal pancreas in vitro.
Horm. Metab. Res. 3, 353 - 354 (1971)

(114) Milner R.D.G., Barson A.J., Ashworth M.A.
Human fetal pancreatic insulin secretion in response to ionic and other stimuli.
J. Endocr. 51, 323 - 332 (1971)

(115) Fujimoto W.Y., Williams R.H.
Insulin release from cultered fetal human pancreas.
Endocrinology 91, 1133 (1972)

(116) Trus M.D., Hintz C.S., Weinstein J.B., Williams A.D., Pagliara A.S., Matschinsky F.M.
Effects of glucose and acetylcholine on islet tissue NADH and insulin release.
Life Sciences, Vol. 22, pp. 809 - 816 Pergamon Press (1978)

(117) Watkins D., Cooperstein S.J., Lazarow A.
Stimulation of insulin secretion by pyridine nucleotides.
Endocrinology 88, 1380 (1971)

(118) Malaisse W.J., Hutton J.C., Kawazu S., Herchuelz A., Valverde I., Sener A.
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin-release.
The links between metabolic and cationic events.
Diabetologia 16, 331 - 341 (1979)

(119) Grimm A.
Glutathion und Insulinsekretion: Mikromethoden zur Bestimmung reduzierten und oxidierten Glutathions in Langerhansschen Inseln. Beziehung zwischen dem GSH/GSSG - Quotienten und glucoseinduzierter Insulinsekretion.
Dissertation Tübingen (1978)

(120) Ammon H.P.T., Grimm A., Wagner-Teschner D., Verspohl E., Händel M.
GSH/GSSG and NADPH/NADP ratios of pancreatic islets depend on glucose concentration.
Diabetes 27 Suppl. 2, 466 (1978)

(121) Kosower N.S., Kosower E.M., Wertheim B., Correa W.S.
Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione of the disulfide.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 593 - 596 (1969)

(122) Sies C., Gerstenecker C., Menzel H., Flohé L.
Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides.
Febs Lett. 27, 171 - 175 (1972)

(123) Ammon H.P.T., Akhtar M.S., Grimm A., Niklas H.
Effect of methylene blue and thiol oxidants on pancreatic islet GSH/GSSG ratios and tolbutamide mediated insulin release in vitro.
Nauyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 307, 91-96 (1979)

(124) Hellmann B., Idahl L.A., Lernmark A., Sehlin J., Täljedahl I.B.
Membrane sulphydryl groups and the pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues.
Diabetes: Proc. 8th Congr. IDF Amsterdam
Excerpta Medica pp. 65 - 78 (1974)

(125) Hägele R.
Einfluß extrazellulär und intrazellulär wirkender Thioloxidantien auf die ^{45}Ca-Aufnahme Langerhansscher Inseln der Ratte.
Dissertation Tübingen (1981)

(126) Ammon H.P.T., Grimm A., Lutz S., Wagner-Teschner D., Händel M., Hagenloh I.
Islet glutathione and insulin release.
Diabetes 29, 830 - 834 (1980)

(127) Jungermann K., Möhler H.
Biochemie
Springer Verlag (1980)

(128) Eggleston L.V., Krebs H.A.
Regulation of the pentose phosphate cycle.
Biochem. J. 138, 425 - 435 (1974)

(129) Mareni C., Gaetani G.F.
$NADP^+$ and NADPH in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes under oxidative stimulation.
Biochim. et Biophys. Acta 430, 395 - 398 (1976)

(130) Ashcroft S.J.H., Randle P.J.
Enzymes of glucose metabolism in normal mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 119, 5 - 15 (1970)

(131) Ashcroft S.J.H., Christie M.R.
Effects of glucose on the cytosolic ratio of reduced/oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in rat islets of Langerhans.
Biochem. J. 184, 697 - 700 (1979)

(132) Berne C.
Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-converting enzymes and adenosine triphosphate citrate lyase in some tissues and organs of new zealand obese mice with special reference to the enzyme pattern of the pancreatic islets.
J. Histochem. Cytochem. 23, 660 - 665 (1975)

(133) Agren A., Berne C., Brolin S.E.
The activity of glutathione reductase in A_2-cell and B-cell-rich pancreatic islets.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 359, 427 - 429 (1978)

(134) Beutler E.
Gluthatione reductase
in: Flohé L., Benöhr H.C., Šies H., Waller H.D., Wendel A. (eds.)
Glutathione
Georg Thieme Verlag Stuttgart

(135) Gold G., Reaven G., Reaven E.
Effect of age on proinsulin and insulin secretory patterns in isolated rat islets.
Diabetes 30, 77 - 82 (1981)

(136) Lipson L.G., Bobrycki V.A., Bush M.J., Tietjen G.E., Joon A.
Insulin release in aging: Studies on adenylate cyclase, phosphodiesterase, and protein kinase in isolated islets of Langerhans of the rat.
Endocrinology 108, 620 - 624 (1981)

(137) Abraham E.C., Taylor J.F., Lang C.A.
Influence of mouse age and erythrocyte age on glutathione metabolism.
Biochem. J. 174, 819 - 825 (1978)

(138) Hazelton G.A., Lang C.A.
Glutathione contents of tissues in the aging mouse.
Biochem. J. 188, 25 - 30 (1980)

(139) Leathem J.H., Appel N.M.
Adrenal and gonadal glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in ageing rats.
Short communications.
J.Endocr. 75, 433 - 434 (1977)

(140) Ammon H.P.T., Hoppe E., Eujen R., Lutz S.,
Effect of leucine on GSH-levels of rat pancreatic islets.
Horm. Metab. Res. 13, 60 - 61 (1981)

Lebenslauf

Am 24. Februar 1955 wurde ich, Gisela Bumiller, geb. Trier, als Tochter des Regierungsvermessungsrates Klaus Trier und seiner Ehefrau Edith, geb. Wieland, in Heilbronn geboren.
Von April 1962 bis April 1966 besuchte ich die Volksschule in Weingarten (Württ.) und wechselte anschließend in das Mädchengymnasium in Ravensburg über, wo ich im Juni 1974 die Reifeprüfung ablegte.
Im Oktober 1974 nahm ich das Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen auf und legte dort im September 1976 den ersten Teil und im März 1978 den zweiten Teil der Pharmazeutischen Prüfung ab.
Von April 1978 bis März 1979 absolvierte ich das Jahr als Pharmazie - Praktikantin in der Alemannen - Apotheke in Holzgerlingen und bestand im April 1979 in Stuttgart den dritten Teil der Pharmazeutischen Prüfung.
Die Approbation als Apothekerin wurde mir am 11. April 1979 erteilt.
Im Mai 1979 begann ich an der Universität Tübingen bei Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon mit der vorliegenden Dissertation, die ich im März 1982 beendete.
Von Mai 1979 bis Februar 1981 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen tätig.
Von April 1981 bis Oktober 1981 war ich in der Kapellen - Apotheke in Senden (Schwaben) als Approbierte angestellt.
Seit November 1981 bin ich Inhaberin der Germanen - Apotheke in Neu-Ulm 4.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Professor Dr.
H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren
H. Auterhoff und K.-A. Kovar (Pharm. Chemie),
E. Graf und H. Hamacher (Pharm. Technologie),
E. Reinhard (Pharm. Biologie), J. Schultz (Biochemie),
E. Lindner (Anorgan. Chemie), E. Bayer (Org. Chemie),
R.E. Bader (Medizin. Mikrobiologie), H. Seiler (Physik),
M. Siess (Pharmakologie).

Druck und Gesamtherstellung:

Bölk & Schulz · Kopier- und Drucktechnik
Bismarckstr. 92
7400 Tübingen · Tel. 07071/32321